

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



EL ANGIOEDEMA HEREDITARIO:
ESTUDIO GENÉTICO DE LA POBLACIÓN
ESPAÑOLA Y ANÁLISIS FUNCIONALES EN
PACIENTES HOMOCIGOTOS PARA LA
DEFICIENCIA DE C1 INHIBIDOR.

TESIS DOCTORAL

Alberto López Lera

MADRID, 2010

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**EL ANGIOEDEMA HEREDITARIO:
ESTUDIO GENÉTICO DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA Y
ANÁLISIS FUNCIONALES EN PACIENTES HOMOCIGOTOS
PARA LA DEFICIENCIA DE C1 INHIBIDOR.**

Memoria para optar al grado de Doctor

Alberto López Lera

Licenciado en Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Margarita López Trascasa

Químico adjunto de la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz

Tutor: Prof. Jesús Cruces Pinto

Catedrático del Depto. De Bioquímica

Facultad de Medicina UAM

Hospital Universitario "La Paz"
Unidad de Inmunología

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica
Departamento de Medicina

Doña MARGARITA LÓPEZ TRASCASA, Doctora en Ciencias Químicas, Adjunto de la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario "La Paz" de Madrid y, profesor Asociado de La Universidad Autónoma de Medicina.

CERTIFICA:

Que Don Alberto López Lera, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título "Angioedema hereditario. Estudio genético de la población española y análisis funcionales en pacientes homocigotos para la deficiencia de C1 Inhibidor", y que considera que reúne las condiciones para ser defendido como tesis doctoral.

El trabajo esta centrado en la caracterización de mutaciones en el angioedema hereditario Tipo I, II y III. En la serie de pacientes estudiados se describe el segundo paciente con una mutación en homocigosis en el angioedema hereditario por déficit de inhibidor ce C1, incluyéndose estudios funcionales de las dos únicas mutaciones descritas en homocigosis en este gen.

En Madrid, a 20 de Septiembre del 2010

Fdo:



Dra. Margarita López Trascasa
Hospital Universitario La Paz

Vto. Bueno del Tutor:



Dr. Jesús Cruces Pinto
Catedrático del Dpto. Bioquímica
Facultad de Medicina UAM

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la doctora Margarita López Trascasa todo su apoyo, paciencia y ayuda tanto en el trabajo de laboratorio, como en la confección y planificación de esta tesis.

Al resto de adjuntos de la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz, los doctores Mari Cruz Rodríguez, Antonio Ferreira, Dora Pascual Salcedo, Rita Álvarez Doorno, Eduardo López Granados y al Profesor Gumersindo Fontán. Por su colaboración durante todos estos años y sus buenos consejos en el laboratorio y en las sesiones de la Unidad.

A las doctoras Pilar Sánchez Corral y Cynthia Abarrategui, de la Unidad de Investigación, por su participación en esta tesis y por su ayuda en el día a día en el hospital, en seminarios y en congresos, desde que llegué a La Paz.

A todos los residentes y becarios, presentes y pasados, con los que he coincidido en la Unidad de Inmunología y especialmente a María, Pilar, Alexandru, Carlos y Arantxa, por el buen ambiente en el hospital y fuera de él. A Rocío, con la que he compartido tantas horas de laboratorio, por su ayuda y su buen humor.

A las técnicas del laboratorio de Inmunoquímica, Gracia, Elena, Mari Mar y Maria Ángeles, y del resto de la Unidad, por haber hecho mucho más fácil el trabajo y por esas chapatas. Y muy especialmente, a Sofía, ya que sin su ayuda, su amistad, y su capacidad de trabajo, esta tesis habría sido imposible.

A Manuela, a mis amigos del 140 y a Nacho, Javi y el resto biólogos, a los que esta tesis ha hecho que os dejara un poco desatendidos, sobre todo durante el último año. Gracias por vuestra paciencia y vuestra amistad.

A mi madre, a Ramón y al resto de mi familia, por haberme apoyado siempre.

RESUMEN

El angioedema hereditario (AEH) es una enfermedad genética rara con un patrón de herencia autosómico dominante. Se caracteriza por una activación descontrolada de los sistemas del complemento y de liberación de kininas que se manifiesta en la aparición recurrente de edemas subcutáneos en cualquier parte del cuerpo. Se han descrito 3 variantes de la enfermedad. El AEH de tipos I y II está causado por mutaciones en el gen *C1NH* que producen una deficiencia cuantitativa o cualitativa de la proteína C1 Inhibidor (C1Inh), perteneciente a la familia de las serpinas. El tipo III o dependiente de estrógenos, afecta predominantemente a mujeres y se ha asociado recientemente a mutaciones de ganancia de función en el factor XII de la coagulación (FXII).

En este trabajo se han estudiado las causas genéticas del AEH en 113 pacientes con AEH tipo I, en 14 con tipo II y en 75 individuos pertenecientes a familias con una sintomatología compatible con el AEH tipo III. Como parte del estudio de los pacientes con AEH de tipos I y II, se han identificado 51 mutaciones distintas en heterocigosis en el gen *C1NH*, 27 de las cuales no habían sido previamente descritas. En muchas de estas mutaciones, se discuten los mecanismos patogénicos en base a la homología existente con otros miembros de la familia de las serpinas.

En nuestra serie de pacientes se caracteriza el segundo caso de deficiencia homocigota de C1Inh (por la sustitución Arg378Cys), una condición que hasta fechas recientes se consideraba letal durante el desarrollo embrionario. Además, el análisis del C1Inh mutante Arg378Cys, sugiere que la Arg378 juega un papel en el control de la liberación de kininas. El estudio del patrón de proteínas del complemento en este paciente antes y a lo largo de 28 meses de tratamiento con andrógenos atenuados, ha permitido mejorar la caracterización del fenotipo asociado a mutaciones homocigotas en *C1NH* y comprobar, por primera vez, el efecto de los andrógenos atenuados en estos pacientes.

Por otro lado, los resultados del estudio en pacientes de AEH tipo III, en el que se ha identificado la mutación Thr309Lys del FXII en 32 pacientes, muestran, además, una alta frecuencia de casos de AEH asociado a estrógenos sin defectos en C1Inh ni FXII, lo que sugiere la implicación de otros genes en la patogenia de esta variante de la enfermedad.

ABSTRACT

Hereditary angioedema (HAE) is a rare genetic disease with an autosomal dominant pattern of inheritance. The disease is caused by uncontrolled activation of complement and kinin cascades which manifests as recurrent episodes of subcutaneous edema. Three variants of HAE have been described so far. HAE types I and II are caused by heterozygous mutations in the C1NH gene resulting in quantitative or qualitative deficiency of the serpin C1 Inhibitor (C1Inh). HAE type III (or estrogen-dependant HAE) affects predominantly women and has been recently associated to gain-of-function mutations in the coagulation FXII.

In the present work, we have analyzed the genetic defects in 127 patients affected of HAE types I and II and in 75 individuals with normal C1Inh antigenic and functional levels and belonging to families with angioedema manifestations compatible with HAE type III.

We have identified 51 different heterozygous mutations in the C1NH gene, 27 of them not previously described, in the patients of HAE types I and II. In most of the cases, the pathological mechanisms of these mutations are discussed taking account of the existing knowledge in other mutant serpins.

We also describe here the second case of C1Inh homozygous deficiency reported, in a patient homozygous for the Arg378Cys substitution, a condition until recently considered embryonically-lethal. Biochemical follow-up of the complement profile in the Arg378Cys homozygous patient during 28 months, allowed us therapeutic assessment and a better characterization of this uncommon condition. Moreover, functional and conformational analysis on this patient's mutant protein revealed an unexpected key role for the Arg378 residue in C1Inh function.

In the HAE type III cohort, we have identified the Thr309Lys substitution in 32 patients with familial history of HAE, while no genetic alteration has been found in the sporadic estrogen-related cases analyzed. These results reveal an unexpected high incidence of the Thr309Lys mutation of FXII in the Spanish population and hint at the existence of other genes explaining disease variability in HAE type III.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	2
- 1.1 Manifestaciones clínicas	2
- 1.2 Diagnóstico molecular	3
- 1.3 Profilaxis y tratamiento	5
2 FISOPATOLOGÍA DEL AEH	7
- 2.1 El sistema del complemento	7
- 2.2 El sistema de activación por contacto y la generación de kininas	9
3 C1 INHIBIDOR	12
- 3.1 La superfamilia de las serpinas	12
- 3.2 Estructura de C1Inh	14
- 3.3 Papel de C1Inh en la homeostasis del suero	16
- 3.4 El gen <i>C1NH</i>	17
- 3.5 Síntesis y catabolismo de C1Inh	18
- 3.6 Defectos de secreción de variantes patológicas de C1Inh	20
4 ANGIOEDEMA HEREDITARIO TIPO III	21
- 4.1 Funciones biológicas de FXII	22
- 4.2 Estudio genético de FXII	23
OBJETIVOS	25
5 MATERIALES Y MÉTODOS	28
- 5.1 Población de estudio	28
- 5.2 Material biológico	28
- 5.3 Estudio bioquímico de proteínas del complemento	29
- 5.4 Extracción de ADN y ARN	29
- 5.5 Estudio genético	29
- 5.6 Síntesis y secuenciación de ADNc	30
- 5.7 Cuantificación de los niveles de ARN mediante RT-qPCR	31
- 5.8 Análisis de grandes deleciones por MLPA	32
- 5.9 Estudios funcionales de interacción con proteasas	32

- 5.10 Análisis conformacional del C1Inh	34
- 5.11 Cultivo de monocitos	35
- 5.12 Lisado de células y cuantificación de la actividad del proteasoma	35
- 5.13 Análisis y predicción de sitio de splicing <i>in silico</i>	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6 ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN DEL C1 INHIBIDOR	38
- 6.1 Mutaciones que producen un cambio de aminoácido	40
- 6.2 Inserciones y deleciones que no alteran el marco de lectura	47
- 6.3 Mutaciones que alteran el marco de lectura o introducen un codón Stop	48
- 6.4 Mutaciones que alteran el proceso de splicing	49
o a) Alteraciones del splicing del exón 2	50
o b) Alteraciones del splicing del exón 3	53
o c) Alteraciones del splicing del exón 7	53
- 6.5 Grandes deleciones	55
7 ESTUDIO DE LA MUTACIÓN ARG378CYS EN HOMOCIGOSIS	59
- 7.1 Descripción clínica y perfil de complemento del paciente GZ	59
- 7.2 Seguimiento clínico y bioquímico	59
- 7.3 Estudio genético de la familia GZ	60
- 7.4 Analogía entre la mutación Arg378Cys de C1Inh y la Z-A1AT	61
- 7.5 Estudios funcionales de la mutación Arg378Cys en plasma y células Cos7	62
- 7.6 Estudios conformacionales de las mutaciones Arg378Cys e Ile440Ser	66
- 7.7 Cuantificación de los niveles de ARNm	68
- 7.8 Cuantificación de la actividad del proteasoma 20S	69
- 7.9 Seguimiento clínico y bioquímico del paciente GZ	71
- 7.10 Discusión general de la mutación Arg378Cys en homocigosis	73
8 ESTUDIO DE PACIENTES CON AEH TIPO III EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA	78
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	86

ABREVIATURAS

Nota: Los términos para los que no se ha encontrado traducción adecuada al castellano, se han mantenido en el inglés original.

ADN	Ácido desoxirribinucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AEH	Angioedema hereditario
AEA	Angioedema adquirido
ATIII	Antitrombina III
A1AT	α -1-antitripsina
BK	Bradikinina
B1R	<i>Bradykinin-1-Receptor</i> ,
B2R	<i>Bradykinin-2-Receptor</i>
C1Inh	C1 Inhibidor
C1q	Subcomponente q de C1
C1r (y C1s)	Subcomponente r (y s) de C1 (serín proteasas)
cADN	ADN complementario
CpG	C y G unidas mediante enlace fosfodiéster
FXI	Factor XI de la coagulación
FXII	Factor XII de la coagulación
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GAGs	glucosaminoglicanos
gC1qR	regiones globulares de C1q
IECA	inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IFN- γ	interferón gamma
IL-6	interleukina-6
HMWK	<i>High Molecular Weight Kininogen</i>
KK	kalikreína
Lys-BK	lisil-bradikinina
LMWK	<i>Low Molecular Weight Kininogen</i>
MAC	complejo de o ataque a membrana
MASP-1 y (-2)	Serín proteasa 1 (2) asociada a la lectina de unión a manano
MBL	<i>Mannose Binding Lectin</i>
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
PAMPS	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PAI-1	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RCL	<i>loop</i> del centro reactivo
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
s5A	Hebra 5 de la lámina \square A
SERPING1/ <i>C1NH</i>	Gen de inhibidor de C1
SINEs	<i>Short Interspersed Elements</i> ,

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El angioedema hereditario (AEH, OMIM#106100) es una inmunodeficiencia primaria con un patrón de herencia autosómico dominante que afecta a entre una de cada 50.000 y una de cada 100.000 personas de la población general (**Notarangelo et al, 2009**). La enfermedad fue inicialmente descrita por Quincke (1882) y Osler (1888) y se caracteriza por la formación espontánea de edemas subcutáneos y submucosos que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Es una enfermedad compleja con baja penetrancia en la que la frecuencia y severidad de los síntomas pueden ser extremadamente variables incluso entre miembros afectos de una misma familia (**Frigas y Nzeako et al, 2002; Weis, 2009**).

En la mayoría de los casos, el AEH está causado por la deficiencia del C1 Inhibidor (C1Inh) (**Donaldson y Evans, 1963**). Esto ha dado lugar a que tradicionalmente se distingan dos variantes genéticas, clínicamente idénticas, denominadas tipos I y II (**Rosen et al, 1965**). El AEH tipo I afecta al 85% de los pacientes y está causado por mutaciones que reducen simultáneamente los niveles circulantes en suero y la funcionalidad de C1Inh. El AEH tipo II, que se da sólo en un 15% de los pacientes, se caracteriza por niveles normales o altos de un C1Inh no funcional.

Recientemente, se ha descrito una nueva variante de la enfermedad en la que los niveles plasmáticos y la funcionalidad de C1Inhibidor son normales y que se ha denominado AEH tipo III o angioedema dependiente de estrógenos (OMIM#610618) (**Bork et al, 2000**). El AEH tipo III está causado por mutaciones en el gen del factor XII de la coagulación (FXII) y afecta casi exclusivamente a mujeres, en las que la sintomatología se desencadena o empeora con el aumento de los niveles de estrógenos (como durante el embarazo o por la toma de anticonceptivos orales) (**Dewald, 2006; Cichon et al, 2006**).

1.1 Manifestaciones clínicas

El AEH suele presentarse como un edema recurrente y autolimitado, sin eritema ni prurito, que puede afectar a cualquier parte del cuerpo: extremidades, cara, tronco, genitales y tractos urinario, gastrointestinal y respiratorio. Los episodios suelen remitir

espontáneamente al cabo de entre 24 y 72 horas, aunque en ocasiones el edema puede desplazarse a otras partes del cuerpo y perdurar hasta 9 días. En la mayoría de los casos, los ataques de edema tienen un desencadenante físico o psicológico (trauma, enfermedad o estrés emocional) (**Grigoriadou y Longhurst, 2009; Agostoni y Cicardi, 1992**).

El edema cutáneo en estos pacientes se caracteriza por ausencia de eritema y por presentar márgenes poco definidos. La afectación del tracto gastrointestinal se presenta en un 70-80% de los pacientes de AEH y es una característica distintiva de esta enfermedad, ya que se da muy raramente en otros tipos de angioedema. Puede cursar con náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea, por lo que su sintomatología es confundida habitualmente con la de los cólicos infantiles o la apendicitis aguda (**Bork et al, 2006**). La similitud con las emergencias quirúrgicas se confirma por el hecho de que aproximadamente un tercio de los pacientes de AEH sin diagnosticar han sufrido laparotomías exploratorias o apendicectomías innecesarias durante los episodios abdominales (**Agostoni y Cicardi, 1992**).

La principal causa de muerte en pacientes de AEH es la asfixia por obstrucción respiratoria debida a edema de glotis, un suceso que es responsable de entre el 15% y el 33% de la mortalidad en enfermos que no reciben tratamiento (**Gompels et al, 2005**).

La edad de aparición de los síntomas es muy variable y puede darse antes del primer año de vida o durante la edad adulta, aunque por lo general suele comenzar o empeorar durante la pubertad. El retraso en el diagnóstico es una característica común entre los pacientes de AEH. Se estima que el tiempo medio transcurrido entre la aparición de los primeros síntomas y el diagnóstico de la enfermedad es de más de diez años (**Roche et al, 2005a**).

1.2 Diagnóstico molecular

Las principales características distintivas del AEH desde el punto de vista clínico son la ausencia de prurito y la falta de respuesta al tratamiento habitual de los edemas de tipo alérgico (antihistamínicos, adrenalina o esteroides). El diagnóstico diferencial se realiza mediante medidas bioquímicas y estudio genético (**Nzeako et al, 2001**).

En el AEH de tipos I y II, la ausencia de C1Inh funcional (ya sea por deficiencia cuantitativa o por alteración de la función de la proteína) produce una desregulación de la vía clásica del complemento que se manifiesta, en ambos casos, en un consumo del componente C4. El diagnóstico requiere, por lo tanto, la medida de los niveles circulantes y la funcionalidad de C1Inh, así como la cuantificación de C4. Aunque es poco común (2% de los pacientes), los niveles de C4 pueden normalizarse entre cada episodio de angioedema, por lo que concentraciones normales de este componente no permiten descartar el diagnóstico de AEH.

Unos niveles antigénicos de C1Inh en suero por debajo del 30% son indicativos de AEH tipo I, mientras que niveles normales o incluso elevados de un C1Inh con una funcionalidad inferior al 50% son característicos del AEH tipo II. El diagnóstico de AEH de tipos I y II puede apoyarse, además, en la historia familiar y en la clínica del paciente, aunque en un porcentaje relativamente alto, no existe historia familiar (hasta el 25% de los casos) o no se desarrollan síntomas (aproximadamente el 5% de los pacientes son asintomáticos) (**Pappalardo et al, 2000**).

En el AEH tipo III los niveles y la función de C1Inh, así como la concentración de C4 son normales. Ante la sospecha de AEH en estos pacientes, el diagnóstico se basa en la asociación de las manifestaciones clínicas con niveles altos de estrógenos circulantes y en el estudio genético del *F12*.

El angioedema puede ser, además, resultado de enfermedades alérgicas, del consumo de medicamentos como los inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA) o los antagonistas del receptor de la angiotensina II (**Agostoni y Cicardi, 2001; Israili y Hall, 1992**), o debido a una deficiencia adquirida de C1Inh (angioedema adquirido o AEA). El AEA suele aparecer asociado a enfermedades linfoproliferativas o, más raramente, a procesos infecciosos o autoinmunes (**Farkas et al, 2001**). El consumo de C1Inh en el AEA se debe a un exceso de paraproteínas e inmunocomplejos o a la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra C1Inh (**Cicardi y Zanichelli, 2010**). Aunque la clínica en pacientes de AEA es idéntica a la del AEH, se distingue de ésta en la ausencia de historia familiar, una edad de inicio tardía y en el consumo de los componentes C1q, C1r y C1s de la vía clásica del complemento.

1.3 Profilaxis y tratamiento

El tratamiento del AEH varía dependiendo de la frecuencia y severidad de los ataques que sufre el paciente. Si la frecuencia es superior a un ataque al mes, si hay historia previa de afectación laríngea con compromiso respiratorio o si la gravedad de los ataques incapacita al paciente durante más de cinco días al mes, se recomienda el tratamiento profiláctico a largo plazo. Éste puede realizarse con andrógenos atenuados, ácido tranexámico o concentrado de C1Inh derivado de plasma (**Agostoni et al, 2004**).

Los andrógenos atenuados (17- α alquilados) llevan utilizándose desde los años 70 como tratamiento profiláctico del AEH. Los mecanismos precisos por los cuales ejercen su efecto protector no se conocen con exactitud pero se ha sugerido que actúan sobre elementos reguladores en el promotor del gen de C1Inh, aumentando la síntesis de ARN mensajero (**Pappalardo et al, 2003**). Los andrógenos más empleados para el tratamiento del AEH son el danazol y el estanozolol. Ambos han demostrado ser efectivos reduciendo la frecuencia de los ataques, aunque su uso continuado se ha asociado con un incremento del riesgo de efectos adversos que incluyen ganancia de peso, virilización y alteración del ciclo menstrual en mujeres, dislipidemia, aterosclerosis e hipertensión arterial (**Agostoni et al, 2004; Bork et al, 2006; Szeplaki et al, 2005**).

Debido a su naturaleza esteroidea, los andrógenos son catabolizados en el hígado, por lo que pueden producir hepatotoxicidad, necrosis hepática y colestasis. Se han descrito algunos casos de adenomas hepatocelulares (**Bork y Schneiders, 2002**) y hepatocarcinomas (**Confabreux et al, 2003**) asociados al tratamiento a largo plazo. Debido a estos efectos secundarios, su uso está contraindicado en niños, embarazadas o durante la lactancia.

El ácido tranexámico es un agente antifibrinolítico que inhibe competitivamente la activación del plasminógeno reduciendo la producción de plasmina. Es menos efectivo que los andrógenos atenuados para el tratamiento del AEH y tiene, también, algunos efectos secundarios (mialgia, rabdomiolisis, debilidad muscular e hipotensión), pero es el tratamiento más utilizado en pacientes de AEH antes de la pubertad o cuando el uso de andrógenos atenuados está contraindicado (**Farkas et al, 2007**).

El concentrado de C1Inh es especialmente efectivo para el tratamiento de ataques agudos, pero puede emplearse también como agente profiláctico. Se obtiene por purificación y pasteurización a partir de plasma humano y tiene una vida media en circulación de entre 32 y 47 horas (**De Serres et al, 2003**). Aunque tiene pocos efectos secundarios, se han descrito algunos casos de pacientes que desarrollan ataques de angioedema recurrentes 24-72 horas después del tratamiento (**Davis, 2008**). Hasta la fecha, no se ha observado en ningún paciente la formación de autoanticuerpos como resultado de la administración de C1Inh concentrado.

En situaciones en las que se prevé que exista riesgo de un ataque de angioedema (por ejemplo antes de procedimientos quirúrgicos o extracciones dentales), los pacientes suelen recibir un tratamiento profiláctico a corto plazo. El tratamiento de elección es, por su efecto protector inmediato, el concentrado de C1Inh. En caso de que no se disponga de este concentrado, los andrógenos atenuados o el ácido tranexámico son también efectivos si se administran con la pauta adecuada (desde 5 días antes de la intervención hasta 2 días después) (**Cicardi y Zingale, 2003**).

Los ataques agudos en los que existe edema en las vías respiratorias o afectación abdominal deben ser tratados inmediatamente (**Agostoni et al, 2004**) y en tales casos, el tratamiento más efectivo es el concentrado de C1Inh. Los andrógenos atenuados y el ácido tranexámico no son efectivos a no ser que se administren con antelación, por lo que no se usan para el tratamiento de ataques agudos. En caso de que no se disponga de otro tratamiento, puede utilizarse también plasma fresco congelado (**Pickering et al, 1969; Prematta et al, 2007**)

En 2008, la Agencia Europea del Medicamento aprobó el uso del Icatibant (HOE 140; Firazyr[®]), un antagonista del receptor B2 de la bradikinina, para el tratamiento de ataques agudos de AEH. Como demostró el ensayo clínico en fase III, FAST-2, el Icatibant es efectivo reduciendo hasta en un 30% los síntomas de un ataque agudo solo 2 horas después del inicio del edema, frente a las 12 horas que se necesitan para obtener un efecto equivalente con el ácido tranexámico (**Bork et al, 2007**).

2. FISIOPATOLOGÍA DEL AEH

La sintomatología del AEH se debe a la falta de regulación sobre dos importantes cascadas proteolíticas del suero: el sistema del complemento y el sistema de activación por contacto (o sistema de las kininas). Durante los episodios de edema en pacientes de AEH de tipos I y II, los niveles de C1Inh se reducen hasta en un 30% y esto produce la activación espontánea de ambos sistemas y la liberación de péptidos vasoactivos (**Berrettini et al, 1986; Cugno et al, 2003**). Actualmente todas las evidencias indican que la activación descontrolada del sistema de contacto, a través de la liberación del mediador bradikinina, es la principal responsable del aumento de permeabilidad vascular en el AEH (**Davis et al, 2010**).

2.1 El sistema del complemento

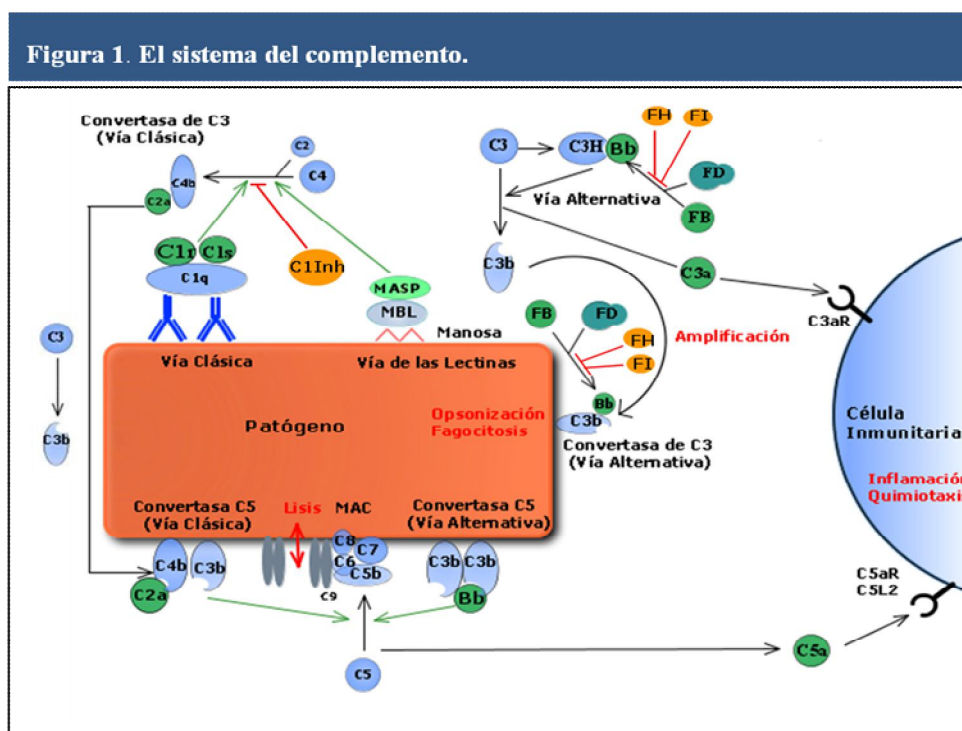
El sistema del complemento es uno de los principales mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria innata frente a microorganismos. Su activación a partir del reconocimiento de un estímulo patogénico, ocurre de forma secuencial mediante el corte proteolítico de zimógenos inactivos y da lugar a la generación de potentes mediadores proinflamatorios (anafilotoxinas), opsonización de la superficie del patógeno y su lisis dirigida mediante el ensamblaje del complejo de ataque a membrana (MAC).

Inicialmente descrito en 1896 por Bordet como un componente termolábil del suero que ‘complementaba’ la actividad bactericida de los anticuerpos, el complemento representa un sistema evolutivamente conservado, con un alto grado de homología estructural y funcional en todos los vertebrados. Estudios genómicos y funcionales de sus principales moléculas efectoras han permitido identificar proteínas análogas en filos más antiguos, como Urocordados, Equinodermos y Cnidarios, lo que pone de manifiesto la antigüedad y ubicuidad de este sistema en el reino animal (**Zhu et al, 2005**).

La activación del complemento tiene lugar a través de tres vías distintas: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas. Estas tres vías, estrechamente relacionadas filogenéticamente, se diferencian en sus mecanismos de activación y en las etapas iniciales, pero todas ellas confluyen en la formación de complejos enzimáticos

multimoleculares responsables de la activación del componente C3 denominados “convertasas de C3” (Carroll, 2004) (Fig. 1).

La vía clásica es activada principalmente a través del reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). La proteína C1q, junto con las proenzimas C1r y C1s (complejo C1), se une a la región Fc de las inmunoglobulinas (generalmente IgG1 e IgM) presentes en los inmunocomplejos y sufre un cambio conformacional que induce la activación autocatalítica de C1r y C1s. Una vez activado C1s, éste corta a C4 y C2, generando los fragmentos que constituyen la convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2a). Dado que los complejos Ag-Ac se forman constantemente en la circulación, los pasos iniciales de la vía clásica están sometidos a un control adicional por parte del C1Inh, que regula la activación de las proenzimas de C1s y C1r y el corte de C4 y C2.



Las tres vías del complemento tras su activación por patógenos.

La activación de la vía alternativa se inicia con la hidrólisis espontánea del enlace tioéster de C3, sin que medie ninguna activación proteolítica. La forma hidrolizada de C3 (C3H en la Fig.1), puede unirse al Factor B (FB), permitiendo que este pueda ser activado por el Factor D y generar la convertasa de C3 de fase fluída (C3HBb). Este

complejo no covalente y dependiente de Mg^{2+} se forma constantemente en la circulación y produce moléculas de C3b que pueden quedar en solución y ser inactivadas por las proteínas reguladoras Factor H (FH) y Factor I (FI) o unirse covalentemente a superficies activadoras (membranas de patógenos) y dar lugar a la convertasa de C3 de superficie de la vía alternativa (C3bBb) (**Frank, 2010**).

La vía de las lectinas es homóloga a la vía clásica, pero utiliza la lectina MBL (*Mannose Binding Lectin*) y varias ficolinas para su activación. MBL reconoce patrones específicos de residuos de manosa presentes en la superficie de los patógenos (PAMPS, de *Pathogen Associated Molecular Patterns*) y activa a las proteasas MASP-1 y MASP-2 (*MBL-Associated Serine Proteases*). Este mecanismo de activación, está estrechamente regulado por la unión de proteínas reguladoras (C1Inh y α 2-macroglobulina) a las proteínas MASP. MASP-1 y MASP-2 tienen una alta homología con las proteasas C1r y C1s de la vía clásica y son igualmente capaces de cortar a C4 y C2, generando la convertasa de C3 de la vía clásica.

La proteólisis de C3 por cualquiera de estas tres vías, genera las moléculas C3a (potente anafilotoxina que induce quimiotaxis, degranulación de mastocitos y opsonización) y C3b, que formará parte de las convertasas de C5 de las vías clásica (C4b2a3b) y alternativa (C3bBbC3b). En ambos casos, las convertasas de C5, que se encuentran unidas a superficies diana, inician la proteólisis de C5 (liberando la anafilotoxina C5a) y la polimerización del resto de componentes terminales (C6, C7, C8 y C9) para formar el MAC (**Walport, 2001a**).

2.2 El sistema de activación por contacto y la generación de kininas.

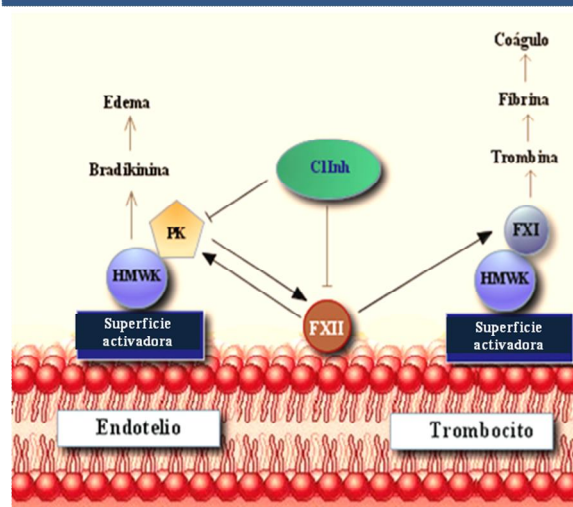
Las kininas, bradikinina (BK) y lisil-bradikinina (Lys-BK), son potentes péptidos vasoactivos que inducen aumento de permeabilidad vascular, causan vasodilatación, dolor y contracción del músculo liso, y estimulan el metabolismo del ácido araquidónico (**Margolius, 1998**). Se liberan a partir de moléculas precursoras (kininógenos) por la acción kininogenasa de la kalikreína (KK). En humanos se han identificado dos tipos de kininógenos: de alto peso molecular (*High Molecular Weight Kininogen* o HMWK) y de bajo peso molecular (*Low Molecular Weight Kininogen* o LMWK). Los kininógenos son sintetizados por los hepatocitos y liberados al plasma,

donde, además de generar kininas, funcionan como cofactores del sistema de la coagulación, inhiben cisteín-proteasas y participan en la respuesta de fase aguda. Las kininas pueden ser liberadas por dos vías distintas: (i) la generación de BK por activación del FXII de la coagulación (activación por contacto); (ii) la liberación de Lys-BK por kalikreínas tisulares (proceso menos estudiado al que no haremos referencia en este trabajo) (**Dendorfer et al, 1999**).

La kalikreína circula en el plasma en forma de zimógeno (prekalikreína) formando un complejo con el HMWK y el FXII. Este complejo es capaz de unirse a superficies negativamente cargadas y a colágeno. Cuando se produce daño tisular, el FXII se activa sobre la superficie celular y convierte prekalikreína en KK, que a su vez corta el HMWK, liberando BK. El FXII activado en estas condiciones puede, además, cortar proteolíticamente al FXI, unido también a moléculas de HMWK sobre la superficie de las plaquetas, iniciando así la vía intrínseca de la coagulación (**Fig.2**). La progresión de esta vía y el corte de fibrinógeno por plasmina, produce varios péptidos, como el fibrinopéptido B, que potencian la acción de la BK y tienen un efecto quimiotáctico sobre las células fagocíticas.

La BK puede ser degradada por la kininasa I en el plasma o por la carboxipeptidasa M sobre las membranas celulares, generando las especies des-Arg⁹-BK y Lys-des-Arg⁹-BK. Se han identificado receptores de membrana en las células endoteliales tanto para la BK (*Bradykinin-2-Receptor*, B2R) como para sus productos de degradación (*Bradykinin-1-Receptor*, B1R) y actualmente se discute sobre la contribución específica de cada receptor al aumento de permeabilidad vascular causado por las kininas (**Kaplan y Ghebrehiwet, 2010**).

Figura 2. Sistema de activación por contacto.



Las superficies activadoras inducen la activación recíproca de la PK y el FXII, lo que da lugar a la liberación de kininas y a la progresión de la vía intrínseca de la coagulación.

Experimentos *in vitro* han sugerido que existen interacciones entre los sistemas de generación de kininas por el sistema de contacto, la fibrinólisis y el complemento, que conducen a la transactivación de estas cascadas proteolíticas, de manera que las proteasas de una ruta pueden activar a las demás vías (**Davis, 2005**). Entre los ejemplos de transactivación con posibles implicaciones patológicas, cabe destacar la activación de C1r por FXIIf, uno de los fragmentos producidos tras la activación de FXII (**Ghebrehiwet et al, 1981, 1983**), o la proteólisis de C4 y C3 por acción de la KK, (**Kirchfink y Borsos, 1988**). En experimentos *in vitro*, la KK activa también la vía alternativa del complemento cortando al FB y dando lugar a la formación de la convertasa de C3 de esta vía (**Hiemstra et al, 1985**).

Aunque la activación recíproca de estos sistemas no se ha demostrado *in vivo*, de confirmarse supondría que la activación de cualquiera de las tres vías desencadenaría, en último término, la liberación de BK y el consumo acelerado de C1Inh y otras proteínas reguladoras.

En el contexto del AEH, la activación del sistema de las kininas se evidencia por la presencia en el plasma de los pacientes, de altas concentraciones de BK y de HMWK cortado (**Berrettini et al, 1986; Lämmle et al, 1988**) y por la producción local de BK en el foco de edema (**Nussberger et al, 1999**). Estudios en modelos murinos deficientes de C1Inh (*C1NH^{-/-}*) y dobles deficientes de C1Inh y del receptor tipo 2 de BK (*C1NH^{-/-}*

B2R^{-/-}), han demostrado que, si bien la deficiencia de C1Inh no produce síntomas claros de angioedema en los ratones *C1NH*^{-/-}, sí causa un aumento evidente de la permeabilidad vascular que no afecta a los dobles deficientes *C1NH*^{-/-} *B2R*^{-/-} y que puede ser bloqueado selectivamente en los ratones *C1NH*^{-/-} mediante la administración de HOE 140 (Icatibant), antagonista del B2R (**Han et al, 2002**). Estos resultados sugieren un papel central del B2R en el aumento de permeabilidad vascular que se observa en el AEH, aunque trabajos más recientes han puesto de manifiesto la implicación, todavía no muy bien comprendida, del B1R y del receptor endotelial para las regiones globulares de C1q (gC1qR) en este proceso (**Bossi et al, 2009**).

3. C1 INHIBIDOR.

C1 Inhibidor (C1Inh, SERPING1) es una glicoproteína de 105kDa que presenta una estructura dividida en dos dominios bien definidos: un dominio N-terminal tipo mucina, sin homología clara con ninguna otra proteína en humanos y un dominio globular C-terminal, tipo serpina, de unos 400aa. Es la proteína más glicosilada del plasma, siendo un 35% de su masa aparente debida a azúcares que se distribuyen en 7 O-glicanos y 6 N-glicanos, casi todos (10 de 13) localizados en el dominio N terminal (**Wagenaar-Bos y Hack, 2006**).

3.1 La superfamilia de las serpinas.

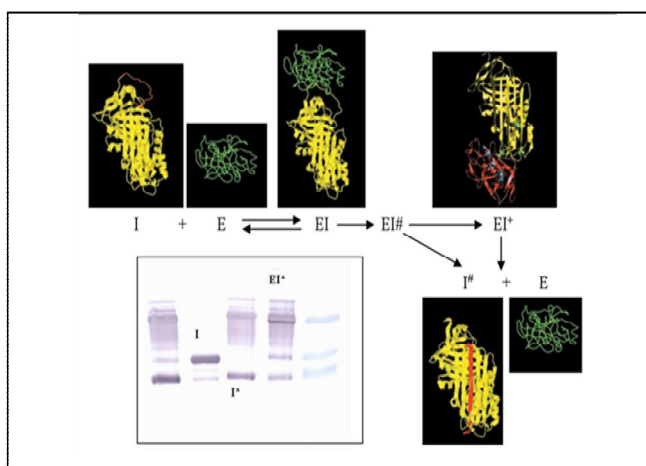
Las serpinas son un grupo de proteínas con estructura similar que fueron inicialmente caracterizadas como inhibidores de serín-proteasas de tipo quimiotripsina. De los más de 1000 miembros de esta familia identificados hasta la fecha, hay 36 proteínas humanas. Algunas de estas proteínas tienen funciones importantes en la homeostasis del suero, como α -1-antitripsina (A1AT, considerada la serpina prototípica desde un punto de vista estructural y funcional), la antitrombina III (ATIII) o el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1).

Las serpinas son proteínas globulares con un alto grado de conservación, formadas por 3 láminas β (denominadas A, B y C) y 8 ó 9 hélices α (A-I), cuyo centro activo (enlace peptídico entre los residuos denominados P1-P1') está localizado en un *loop*

flexible y expuesto (*loop* del centro reactivo, RCL). Según la nomenclatura consenso, a partir de P1 y en dirección amino Terminal, los aminoácidos se nombran P2, P3..., y a partir de P1' y en dirección carboxilo Terminal, P2', P3'... Una característica distintiva del dominio serpina es que su estructura nativa no representa la conformación más estable de la molécula, sino un intermediario metaestable (**Simonovic y Patston, 2000**). Las serpinas funcionan como inhibidores suicidas de proteasas, exponiendo en su centro activo un enlace peptídico que sirve como sustrato proteolítico para sus dianas. El centro activo de cada serpina determina su especificidad como sustrato, ya que las proteasas diana reconocen los residuos del enlace P1-P1' como punto de corte. Tras el contacto inicial con una proteasa, ambas proteínas se unen de manera no covalente formando un complejo de Michaelis transitorio que no produce ningún cambio conformacional. Después de este primer contacto, la proteasa corta el centro activo de la serpina y se une a ella covalentemente, induciendo la inserción del RCL en la zona globular del dominio como una cuarta lámina β y con ello la migración de la proteasa al polo opuesto de la serpina, donde queda inhibida irreversiblemente. Esta movilidad del RCL permite a las serpinas adoptar distintas conformaciones en estado fisiológico y las hace sensibles a mutaciones que alteren o impidan las transiciones conformacionales (**Figura 3**).

Dependiendo del grado de inserción del RCL, las serpinas pueden adoptar hasta cinco conformaciones diferentes: la forma nativa, la cortada, la latente, la polimérica y la forma δ (**Whisstock et al, 1998**). En conformación latente, el RCL intacto se inserta en la lámina β A sin que haya interacción previa con proteasas diana. La forma δ , que se ha identificado en la antiquimiotripsina mutante Leu55Pro, es un estado intermedio con inserción parcial del RCL.

Figura 3. Mecanismo de inhibición de las serpinas



En la figura se representa la transición conformacional sufrida por las serpinas (I) para la inhibición de proteasas (E). La interacción con la proteasa genera intermediarios de reacción tipo Michaelis (EI#) que pueden progresar hacia la formación de complejos inhibidores estables (EI*) o a la liberación de la proteasa activa y de la serpina cortada (I*). En la esquina inferior izquierda, se muestra el aspecto de cada variante conformacional en un SDS-PAGE al 8%.

En algunas serpinas (como A1AT), la forma latente es un intermediario hacia la conformación polimérica. El mecanismo habitual de polimerización de las serpinas es la inserción del RCL de una molécula en la lamina β A de otra adyacente (inserción *loop-sheet*) y resulta en la formación de agregados intracelulares insolubles que pueden ser patogénicos y dar lugar a una serie de trastornos globalmente denominados serpinopatías (Lomas y Carrell, 2002; Takahashi et al, 2005; Zhou y Carrell, 2008).

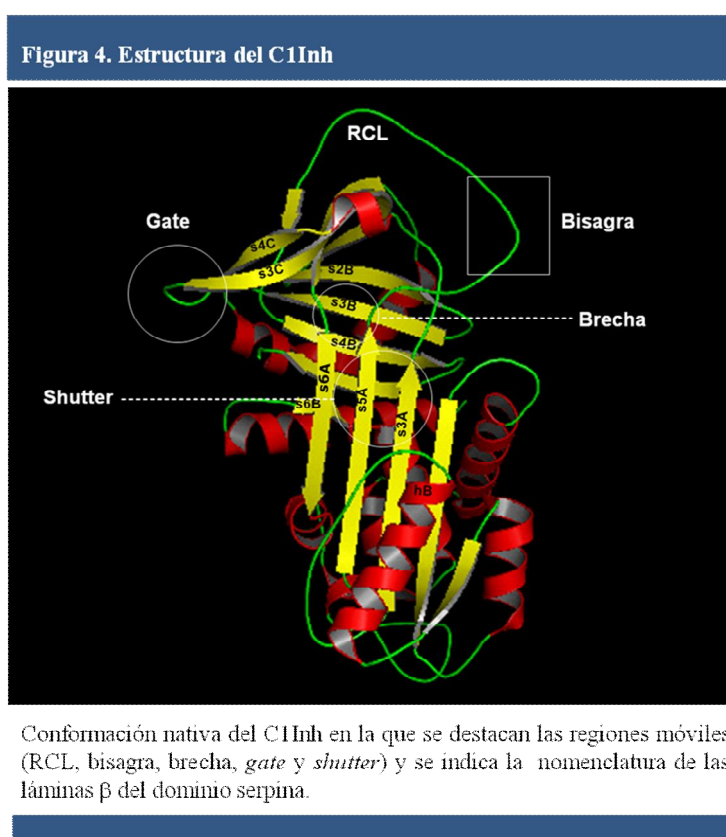
Aunque la mayoría de las serpinas actúan inhibiendo proteasas del suero, estudios filogenéticos recientes han demostrado que existen serpinas con actividades muy diferentes (transporte hormonal, supresión de oncogenes, actividad chaperona) y que esta superfamilia está ampliamente representada tanto en eucariotas como en bacterias, arqueas y virus (Law et al, 2006).

3.2 Estructura de C1Inh.

C1Inh tiene, en su forma secretada, una longitud de 500aa y es el miembro de mayor tamaño de la familia de las serpinas. El extremo C-terminal de la molécula está constituido por un dominio serpina de 365aa que contiene los residuos P1-P1' del centro activo (Arg444-Thr445). En esta región de la molécula reside su capacidad de inhibir proteasas del suero. El extremo N-terminal, altamente glicosilado y sin homología con ninguna otra proteína, mide 113aa y es, con diferencia, el más largo de todas las serpinas. Este dominio N terminal no es esencial para la inhibición de proteasas y sus

funciones se discutirán en el siguiente apartado. Ambas regiones de la proteína están conectadas por puentes disulfuro entre las cisteínas 101-406 y 108-183 (Beinrhor et al, 2007; Wagenaar-Bos y Hack, 2006).

El dominio serpina de C1Inh tiene 4 regiones móviles, conservadas en todas las serpinas, que son esenciales para que el cambio conformacional ocurra de forma correcta (Whisstock et al, 2000). Estas 4 regiones se denominan: bisagra, *shutter*, brecha y *gate*. La región bisagra comprende los residuos P15-P9 del RCL y actúa como un eje que permite el movimiento del RCL tras ser cortado en P1-P1' por las proteasas. Las regiones *shutter* y *brecha*, localizadas a lo largo de la lámina β A, son esenciales para la inserción del RCL, permitiendo el contacto inicial del *loop* con la región globular de la proteína (en la región brecha) y facilitando la apertura de la lámina β , para la inserción definitiva (Davis et al, 1992). La región *gate* incluye las cadenas 3C y 4C y las estructuras adyacentes. Esta zona forma un giro β a través del cual tiene que pasar el RCL para insertarse en la lámina β A (Figura 4) (Stein y Carrell, 1995).



3.3 Papel de C1Inh en la homeostasis del suero.

La actividad de C1Inh en el suero se caracteriza por su amplio repertorio de dianas: es el principal regulador de la activación del sistema del complemento y participa, además, en el control de la activación del sistema de contacto, la coagulación y la fibrinólisis (**Tabla 1**).

En la vía clásica del complemento, C1Inh se une a los componentes C1r y C1s tras la activación del complejo C1 por inmunocomplejos e impide que la ruta progrese hacia la formación de una convertasa de C3 activa. Es también un regulador parcial de la vía de las lectinas, al inhibir a las proteasas MASP-1 y MASP-2 activadas (**Fig.1**).

En la vía de activación por contacto, es el principal inhibidor de los factores FXII y FXIa, y participa, junto con la α_2 -macroglobulina y la ATIII, en la regulación de la kalikreína (**Fig. 2**).

En ausencia de concentraciones normales de C1Inh funcional, ya sea por mutaciones en el gen de C1Inh (AEH tipos I y II) o por un exceso de inmunocomplejos que consumen el C1Inh circulante en fenotipos adquiridos (AEA), se produce la activación espontánea de los sistemas del complemento y de contacto y la liberación local de bradikinina (**Cicardi et al, 1998; Cugno et al, 2003**).

Tabla 1. Contribución del C1Inh a la inhibición de proteasas del plasma

Proteasa	% de inhibición en plasma debido a C1Inh
Sistema del Complemento	
C1r	100
C1s	100
MASP2	^a
Sistema de Contacto	
Kalikreína	42-84
FXIa	47
FXIIa	90
Sistema de la Fibrinólisis	
Activador Tisular del Plasminógeno	^b
Plasmina	^b

^a Indeterminado, probablemente la α_2 -macroglobulina también participa en la inhibición de MASP-2.

^b En circunstancias normales, el C1Inh tiene un papel menor en el control de estas rutas. Sin embargo, en determinadas situaciones (ataques de angioedema, shock por endotoxinas o ejercicio exhaustivo) se observan cantidades variables de complejos con el Activador Tisular del Plasminógeno y la plasmina.

(Modificado de Davis et al, 2010)

La administración de C1Inh ha demostrado ser útil en diversos modelos animales de inflamación como el rechazo hiperagudo, el síndrome de extravasación capilar, el shock por endotoxinas o el síndrome de isquemia-reperfusión (**De Simoni et al, 2004a; Akita et al, 2003; Hecker et al, 2002**). En estos modelos, el sistema del complemento juega un papel importante como mediador del daño inflamatorio, por lo que el efecto beneficioso de C1Inh se ha atribuido generalmente a su capacidad para inhibir la activación de la vía clásica. Sin embargo, en los últimos años se han descrito nuevas interacciones de C1Inh, independientes de su actividad como serpina y relacionadas con el dominio N terminal, que podrían contribuir a su acción antiinflamatoria.

Por un lado, el dominio N terminal de C1Inh expresa en su superficie tetrasacáridos tipo Lewis^x, a través de los cuales es capaz de unirse a selectinas E y P en las células endoteliales y suprimir el *rolling* y la trans migración de linfocitos en el foco inflamatorio (**Cai y Davis III, 2003; Cai et al., 2005**). Así mismo, puede unirse directamente a endotoxinas producidas por bacterias Gram negativas, impidiendo su interacción con receptores de la superficie de los macrófagos (**Liu et al., 2005**).

Por último, se ha demostrado que además de ser el único regulador de la activación de C1 en la vía clásica y de participar en el control de la vía de las lectinas, C1Inh puede inhibir la activación de la vía alternativa bloqueando C3b e impidiendo su interacción con el factor B (**Jiang et al., 2001**).

3.4 El gen *C1NH*.

El gen que codifica C1Inh (*SERPING1/C1NH*) (MIM#606860; GenBank NM_000062.1) se localiza en el cromosoma 11q12-q13.1 y está compuesto por 8 exones que se extienden a lo largo de una región de 17 Kb. El primer exón es no codificante y el segundo contiene una secuencia de 22 pb que codifica un péptido señal (**Carter et al, 1991**). Los 7 intrones presentan una alta densidad de secuencias repetitivas Alu. Las repeticiones Alu son los elementos intercalados cortos (*Short Interspersed Elements*, SINEs) más comunes del genoma humano y de primates. Por su abundancia (en promedio hay una repetición Alu cada 5-10 Kb) y su tendencia a agruparse en tándem, son sitios comunes de recombinación. En C1Inh pueden producir errores de recombinación y son responsables de la alta tasa de inserciones y deleciones

(hasta un 15% del total de mutaciones) que aparecen en pacientes de AEH (**Stoppa-Lyonnet et al, 1991**).

Las mutaciones causantes de AEH tipo I son muy heterogéneas y pueden localizarse a lo largo de todo el gen, mientras que las mutaciones que producen AEH tipo II afectan exclusivamente al centro activo (P1-P1') o a la región bisagra.

Durante la última década, el estudio genético del *C1NH* en diferentes poblaciones de pacientes de AEH ha permitido identificar más de 200 mutaciones heterocigotas distintas (**Kalmar et al, 2005**) y únicamente tres mutaciones en homocigosis. Dos de ellas, son alteraciones homocigotas en la región promotora (c.-101A>G; c.-103C>T) que presentan un patrón de herencia autosómico recesivo, probablemente debido a que estas mutaciones tienen un efecto leve sobre las concentraciones de C1Inh (**Verpy et al, 1996; Büyüköztürk et al, 2009**). La tercera mutación homocigota descrita hasta la fecha, y la única que afecta a la región codificante del gen, es un cambio de aminoácido en el exón 8 (c.1576T>G; I440S) (**Blanch et al, 2006**).

3.5 Síntesis y catabolismo de C1Inh.

El C1Inh se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también hay síntesis local por parte de monocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y microglía (**Lappin et al, 1986**). Su expresión se incrementa en situaciones de inflamación en respuesta a interferón gamma (IFN- γ) e interleukina-6 (IL-6) (**Zuraw y Lotz, 1990**). El promotor del gen *C1NH* presenta, además, un elemento de respuesta a andrógenos y corticoides. Aunque la terapia con andrógenos atenuados es una práctica común en los pacientes de AEH y produce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de C1Inh *in vivo*, hasta la fecha los estudios *in vitro* no han demostrado que este elemento sea funcional (**Prada et al, 1998**).

Una vez sintetizado y secretado, C1Inh se consume por su interacción con las proteasas y tiene una vida media en el plasma de alrededor de 28 horas (**Levi et al, 2006**).

En pacientes con AEH tipo I, heterocigotos para mutaciones en el gen de *C1NH*, los niveles plasmáticos de C1Inh aparecen muy disminuidos, siendo de solo entre un 5 y

un 30% respecto a valores control, en lugar del 50% esperado (**Prada et al, 1998**). Esta aparente discrepancia, aunque aún no del todo comprendida, parece deberse a una suma de factores entre los que se cuentan un catabolismo aumentado de C1Inh (incluso en pacientes asintomáticos), defectos de síntesis y alteraciones durante el proceso de secreción y el transporte intracelular de la proteína en los pacientes de AEH tipo I (**Gompels et al, 2005**).

En el AEH tipo II, en cambio, la concentración de proteína es normal o incluso alta, pero la proteína no es totalmente funcional. A pesar de que la síntesis de proteína en el tipo II también se ve reducida significativamente (**Pappalardo et al, 2004**), al tener una menor capacidad de interacción con sus proteasas diana, la tasa catabólica de C1Inh es menos acusada y su vida media es mayor.

Estudios de la síntesis de ARNm en pacientes de AEH han puesto de manifiesto la existencia de una gran complejidad en el proceso de síntesis de C1Inh en condiciones patológicas.

Usando cultivos de fibroblastos de pacientes y controles, **Kramer et al (1991)** demostraron que los pacientes con AEH tipo I sintetizan, en promedio, solo un $19 \pm 4\%$ de los niveles del alelo sano en comparación con los controles sanos y que los pacientes con AEH tipo II sufren también una reducción similar (43% respecto a controles); en ambos casos, la regulación de la síntesis tenía lugar pre-traduccionalmente. Además, cuando estudiaron a un paciente de AEH tipo I con una delección en el exón 7, que permitía distinguir fácilmente el alelo sano del mutado tanto a nivel de ARN como de proteína, sus resultados sugerían que existía un mecanismo de transinhibición de la traducción del alelo sano por parte del ARN o la proteína mutados. En efecto, además de bajas tasas de síntesis de ARN tanto en el alelo sano como en el mutado ($52 \pm 2\%$ y $17 \pm 1\%$ de los valores control, respectivamente), estos autores encontraron una tasa de síntesis de proteína aún más disminuida para ambos alelos ($11 \pm 3\%$ para el alelo sano y $3 \pm 1\%$ para el mutado), indicando que existen múltiples niveles de control de la síntesis de C1Inh en los pacientes de AEH tipo I: un nivel de regulación transcripcional que reduce los niveles del alelo mutado por debajo del 50% y un segundo nivel de control, durante la traducción del ARN o en los procesos posteriores de transporte intracelular y secreción, que afecta a los productos de ambos alelos (**Kramer et al, 1993**).

3.6 Defectos de secreción de variantes patológicas de C1Inh

El mecanismo inhibidor de las serpinas implica importantes cambios conformacionales que, bajo ciertas condiciones, las hacen susceptibles de sufrir mutaciones puntuales que induzcan cambios conformacionales aberrantes. Las mutaciones que alteran drásticamente la estructura o las propiedades fisicoquímicas de las regiones móviles de las serpinas (**Apartado 3.2 y Fig.4**), permiten la formación de intermediarios inestables que pueden conducir a la retención intracelular de la proteína o a la formación de polímeros intra o extracelulares debidos a la inserción *loop-sheet* comentada en el apartado 3.2 (**Lomas y Carrell, 2002**).

El fenómeno de la polimerización tiene lugar espontáneamente en serpinas sometidas a calentamiento, al tratamiento con ciertos agentes desnaturalizantes débiles o a cambios de pH en el medio (**Pemberton et al, 1989**).

Las variantes patológicas de A1AT denominadas A1AT-Z (portadora de la sustitución Glu342Lys) y Siiyama (Ser53Phe), son los casos mejor estudiados de mutaciones que inducen la polimerización. El caso de la variante Z de A1AT es particularmente representativo y se ha estudiado en profundidad por sus implicaciones patológicas y por su relativamente alta frecuencia en la población del norte de Europa (4%) (**Lomas et al, 2005**).

Los individuos homocigotos para la mutación sufren deficiencia severa de A1AT, con niveles plasmáticos inferiores al 10% de los valores normales, debido a la retención de los polímeros de proteína en el retículo endoplásmico y tienen, por ello, una alta predisposición a sufrir hepatitis juvenil, enfisema, cirrosis y carcinoma hepatocelular.

El residuo Glu342 de A1AT está localizado en la región *shutter* del dominio serpina. Esta región es importante porque participa en la estabilización del RCL cuando éste se inserta en la lámina β A. Además, se ha demostrado que, en la conformación nativa de las serpinas, existe una red de puentes de hidrógeno que conectan las láminas β s5A y s3A a lo largo de la región *shutter*, que son esenciales para evitar la apertura de ambas láminas y la formación de polímeros (**Zhou et al, 2003**).

El Glu342 participa en la inserción del RCL en la lámina β A estabilizándola al formar un puente salino con la Lys290 de la lámina β 5A (**Fig. 4**). La mutación Glu342Lis en A1AT-Z elimina este enlace y permite la apertura parcial de la lámina β y

la inserción del RCL de moléculas adyacentes (inserción *loop-sheet*, comentada en el apartado 3.2).

En otros miembros de la superfamilia serpina, mutaciones de este tipo no conducen a la formación de polímeros, sino a la retención de la proteína mutante durante el proceso de secreción y a su eliminación por vías proteolíticas. Tal es el caso de la mutación Glu482Lys del Cofactor 2 de la Heparina (Corral et al, 2004), y de la mutación Glu421Lys de la serpina necrótica de *Drosophila* (Green et al, 2003), homólogas a la variante Z de A1AT. En ambos casos, la tasa de síntesis de estas proteínas por los hepatocitos (o la células del cuerpo graso, en el caso de la serpina necrótica) es muy inferior al de A1AT (en torno a un 10%), por lo que las vías de degradación asociadas al retículo endoplásmico son capaces de eliminar las proteínas mal plegadas y no llegan a formarse agregados insolubles (Gooptu y Lomas, 2008).

Se ha demostrado, además, que el acúmulo de estos agregados insolubles en el retículo endoplásmico da lugar a una respuesta de estrés que incluye la activación del sistema ubiquitina-proteasoma (Lomas et al, 2005; Perlmutter et al, 1988).

En el angioedema hereditario se han descrito varias mutaciones causantes de AEH tipo I, en residuos conservados del extremo C terminal del dominio serpina (Leu459, Pro467 y Arg472), que inducen defectos de secreción y la formación de polímeros. Aunque se ha podido comprobar que mutaciones en algunos de estos residuos (Leu459Pro, Leu459Arg y Pro467Arg), bloquean los primeros pasos de la secreción de C1Inh y que, mayoritariamente, éste queda retenido en el retículo endoplásmico (Verpy et al, 1993; Eldering et al, 1995), no existen datos sobre la implicación del sistema ubiquitina-proteasoma u otras vías de degradación intracelular en los defectos de secreción en el AEH.

4. ANGIOEDEMA HEREDITARIO TIPO III.

El AEH tipo III o dependiente de estrógenos es una variante de la enfermedad que ocurre predominantemente en mujeres y cuya sintomatología aparece o se agrava ante concentraciones altas de estrógenos circulantes. Se diferencia del AEH de tipos I y II en que la concentración y la función de C1Inh son normales (Binkley y Davis, 2000).

Esta nueva variante fue descrita por Bork (2000) al estudiar diez familias no relacionadas entre sí en las que todos los miembros afectados de AEH eran mujeres y tenían concentraciones normales de C1Inh y C4 en suero. Durante los años siguientes, distintos análisis de ligamiento en ocho familias alemanas con AEH III permitieron identificar la mutación en heterocigosis Thr309Lys en el exón 9 del FXII de la coagulación como la causante de la enfermedad (**Cichon et al, 2006; Dewald, 2006**). El FXII se había considerado como un gen candidato para esta variante de la enfermedad por dos razones: (i) su actividad proteolítica está involucrada en la generación de kininas (principales responsables de desencadenar el edema en el AEH), (ii) la expresión del gen del FXII y sus niveles en plasma están regulados por estrógenos.

La mutación Thr309Lys no altera los niveles de FXII en suero, pero sí aumenta su funcionalidad: los portadores de esta sustitución tienen una actividad amidolítica del FXII hasta cuatro veces superior a los de la población control. La Thr309 está localizada en un dominio rico en prolinas, una de las tres regiones de la proteína responsables de su unión a superficies con carga negativa. Aunque aún no se conocen con exactitud las consecuencias estructurales de la sustitución de Thr (con carga neutra) por Lys (cargada positivamente) en esta posición, se ha sugerido que la ganancia de función del FXII podría ser el resultado de una mayor activación por superficies cargadas negativamente y/o por la incapacidad de C1Inh para inhibir eficazmente al FXII mutante (**Cichon et al, 2006; Beinrohr et al, 2007**).

4.1 Funciones biológicas de FXII.

FXII es una glicoproteína sérica que participa en el inicio de las cascadas de la coagulación, la fibrinólisis y la producción de BK y angiotensina. Se activa en presencia de polianiones y esto puede ocurrir de dos maneras distintas: (i) por el HMWK en presencia de superficies polianiónicas o polifosfatos de la superficie de plaquetas activadas, (ii) por algunas proteínas, cuando éstas presentan algún defecto de plegamiento (como la proteína β -amiloide, la albúmina o la hemoglobina) (**Müller et al, 2009**). Como se dijo en el apartado 2.3, la activación por HMWK inicia simultáneamente la vía intrínseca de la coagulación (a través del FXI) y la producción de kininas (a través de la kalikreína) (**Fig.2**).

4.2 Estudio genético de FXII.

Varios autores han acometido el estudio genético de FXII para el diagnóstico del AEH tipo III. Hasta la fecha, sólo se han identificado dos mutaciones, ambas en la posición 309 de la proteína: Thr309Lys (c.1032C>A) y Thr309Arg (c.1032C>G). La sustitución Thr309Lys se ha descrito en diferentes cohortes de pacientes en Europa y en el continente americano y se ha postulado que la alta frecuencia y la distribución ubicua de este alelo son el resultado de un único evento de mutación en un ancestro común europeo (**Cichon et al, 2006**).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Identificar la mutación patogénica en el gen *C1NH* en una serie de 127 pacientes de la población española para confirmar o excluir el diagnóstico de AEH de tipos I y II.
2. Analizar los posibles mecanismos moleculares implicados en el efecto patogénico sobre el ARN o la proteína de las mutaciones identificadas en el gen *C1NH*.
3. Caracterizar el perfil de complemento asociado a la deficiencia completa de C1Inh en un paciente con la mutación Arg378Cys en homocigosis y compararlo con el de los dos individuos homocigotos para la mutación Ile440Ser, previamente descritos.
4. Investigar las características funcionales y conformacionales de C1Inh en los pacientes homocigotos para las mutaciones Arg378Cys e Ile440Ser.
5. Estudiar la prevalencia del AEH tipo III y de las mutaciones Thr309Lys y Thr309Arg en pacientes de angioedema asociado a estrógenos de la población española.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES y MÉTODOS

5.1 Población del estudio

La cohorte de pacientes de AEH de tipos I y II, la componían 58 familias (113 pacientes de AEH tipo I y 14 de AEH tipo II) de la población española, con uno o más miembros afectados, que fueron referidas al Servicio de Inmunología del Hospital La Paz entre los años 2006 y 2010. Además, con objeto de investigar la segregación genotipo-fenotipo, se ha incluido a 39 familiares sanos pertenecientes a la mayor parte de las familias del estudio.

Como población control, se utilizaron 50 donantes sanos que habían sido previamente sometidos a análisis genético para identificar posibles variantes polimórficas en el gen *C1NH*. Todos los pacientes, sus familiares y los controles sanos dieron su consentimiento informado para estos estudios.

Para el diagnóstico de AEH tipo III en la población española, se analizaron 37 pacientes con sintomatología de angioedema, ausencia de mutación en el gen *C1NH* y un fenotipo compatible con la variante asociada a estrógenos. Además, siempre que fue posible, se estudiaron al menos dos familiares de cada paciente, hasta un número total de 69 individuos.

5.2 Material biológico

De cada paciente o control, se tomaron muestras de sangre-citrato, sangre-EDTA y sangre en tubo seco (sin anticoagulante) para la extracción de plasma citrato, plasma EDTA y suero. Las muestras de plasma citrato y suero, para los ensayos funcionales, se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser utilizadas. La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo a partir de 20 mL de sangre EDTA fresca. En todos los casos, se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y se recogieron datos clínicos de cada familia incluida en el estudio.

5.3 Estudio bioquímico de proteínas del complemento

Los niveles de las proteínas C3, C4 y C1Inh se cuantificaron a partir de muestras de suero mediante nefelometría (Siemens, Marburg, Alemania). La funcionalidad de C1Inh se valoró con un ensayo cromogénico Berichrom[®] (Siemens). El componente C2 se midió mediante un ensayo hemolítico, como ha sido descrito por otros autores (**Ngan et al, 1977**) y la cuantificación de C1s se realizó mediante un ELISA previamente descrito en nuestro laboratorio (**Blanch et al, 2006**). La concentración de C1q en suero se midió por inmunodifusión radial, utilizando el C1q Binarid Radial Immunodiffusion kit (The Binding Site, Birmingham, UK).

5.4 Extracción de ADN y ARN

Las muestras de ADN y ARN se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica usando los kits Gentra Puregene BloodCore (Gentra systems, Minneapolis, MN) y RNeasy Midi (Qiagen, Valencia, CA), respectivamente y según las indicaciones de las casas comerciales.

5.5 Estudio genético

El análisis de mutaciones en C1NH se llevó a cabo según el protocolo descrito por **Roche et al (2005b)** con ligeras modificaciones. De forma abreviada, los ocho exones, las regiones intrónicas flanqueantes y la región promotora del gen *C1NH* se amplificaron de forma independiente en reacciones de PCR de 50 µL de volumen a partir de 0,5 µg de ADN genómico y utilizando los cebadores y las condiciones previamente descritas por en **Blanch et al (2002)** (**ver apartado de Apéndices**). Los productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa LM-Sieve de bajo punto de fusión (Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid), utilizando el kit QIAquick gel extraction (Qiagen Inc., Valencia, CA) y se secuenciaron las hebras codificante y complementaria en reacciones de 10 µL de volumen, con 5-20 pmoles de cada cebador y utilizando terminadores de secuencia Big Dye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos de secuenciación se precipitaron en etanol al 65%, se lavaron 2

veces en etanol al 70% y se analizaron en un aparato de secuenciación automática (ABI-PRISM 3130, Applied Biosystems).

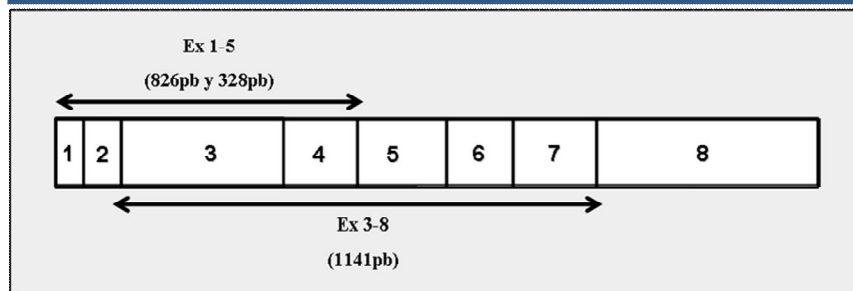
El análisis de mutaciones en el exón 9 del gen F12 se hizo mediante PCR y secuenciación con los cebadores F12Ex9F (5'ACGTGACTGCCGAGCAAG3') y F12Ex9R (5'CCTCTCGGCTCCTCCTTC3'). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 30 µL que contenía 0,5 µg de ADN genómico, 2 mM de dNTPs, 0,8 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania) y 20 pmoles de cada cebador. El protocolo de PCR constaba de una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 30 ciclos con una desnaturalización de 1 min a 94 °C, alineamiento de 30 seg a 59°C y 1 min de extensión a 72°C; y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR resultantes (de 392 pb) se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión, como se ha comentado para el estudio genético del gen *CINH*. Los productos purificados se secuenciaron con los cebadores F12Ex9F y F12Ex9R en reacciones de 10 µL, con 5 µL del producto de PCR amplificado, 10 pmoles de primer directo o inverso y 2 µL de Big Dye v3.1 (Applied Biosystems). La mezcla de reacción se sometió a 3 min a 94°C de desnaturalización inicial seguidos de 25 ciclos de 10 seg a 96°C, 5 seg a 50°C y 4 seg a 60°C en un termociclador Perkin Elmer 9700 (Applied Biosystems) y se analizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

5.6 Síntesis y secuenciación de cADN

En los pacientes que presentaban cambios en secuencias canónicas de splicing o en posiciones cercanas, se abordó el estudio cualitativo de las posibles alteraciones en el procesamiento del ARN. Se sintetizó cADN correspondiente a dos fragmentos solapantes del ARNm (exones 1 a 5 y exones 3 a 8) utilizando cebadores y condiciones previamente descritos (**Fig.5 y Apéndices**). Los fragmentos resultantes se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión como se ha descrito anteriormente y se secuenciaron utilizando los mismos cebadores empleados para la amplificación por RT-PCR según las condiciones descritas por **Roche et al, 2005b**.

Figura 5. Estrategias de análisis de cADN



Para estudiar los efectos de mutaciones sobre el *splicing* del ARN, se amplificaron y secuenciaron dos fragmentos de cADN solapantes:

- El fragmento 1, que abarca los exones 1 al 5 y que presenta, en individuos control, dos bandas (826pb y 328pb) debidas al *splicing* alternativo del exón 3.
- El fragmento 2, de 1141pb, que se extiende desde el extremo 3' del exón 2 hasta el extremo 5' del exón 8.

5.7 Cuantificación de los niveles de ARN mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Se sintetizó cADN total de pacientes y controles a partir de 1 µg de ARN en reacciones de 20 µL de volumen con 0,5 µg de cebador Oligo(dT)₁₂₋₁₈, 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl₂ y 50 unidades de enzima Superscript II RT, siguiendo las indicaciones del kit SuperScript™ First-Strand (Invitrogen, Barcelona, España). El cADN de *CINH* se amplificó utilizando cebadores específicos de secuencia previamente descritos (Pappalardo et al, 2004) (Apéndices) y siguiendo un protocolo adaptado para su uso en un sistema Light Cycler 1.5 con SYBR GREEN I (Roche Applied Science). Como control endógeno para los procedimientos de normalización de ARN se utilizó el gen de la Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Todos los experimentos se hicieron por triplicado y usando una curva estándar generada a partir de cuatro diluciones seriadas de dos muestras control. Las mezclas de reacción se prepararon con 3,125 mM de MgCl₂, 0,5 pmoles/µL de cada cebador, 1X Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I y agua hasta un volumen final de 18 µL. La cantidad relativa del ARN de *CINH* se calculó con las medianas de cada triplicado y se expresó como un porcentaje del ARNm de *CINH* cuantificado en tres controles sanos.

5.8 Análisis de grandes deleciones por Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Con objeto de descartar la presencia de grandes duplicaciones o deleciones en la región codificante del gen *C1NH*, en los pacientes en los que no se encontraron mutaciones puntuales, se llevaron a cabo análisis mediante la técnica de MLPA con el kit P243 SERPING1 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

5.9 Estudios funcionales de interacción con proteasas en plasma y sobrenadantes de células Cos-7.

Además de medir la capacidad de unión del C1Inh a C1s con ensayos colorimétricos (Berichrom), la interacción con C1s y kalikreína se cuantificó mediante western blot y ELISA. El western blot para el estudio cualitativo del C1Inh en plasma se llevó a cabo como se ha descrito previamente (**Blanch et al, 2006**).

El western blot para el estudio de la interacción con C1s se desarrolló a partir de 2 µl de plasma de pacientes y controles diluidos 1:10, con o sin una incubación previa de 1 hora a 37°C con un exceso molar de C1s, en geles de SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras. Las proteínas se transfirieron, durante 12 horas a 4°C y 250 mA, a membranas Inmobilon P (Millipore, Bedford, Mass) y se saturaron con una solución de leche desnatada al 2% en PBS-Tween al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados en PBS-Tween al 0,1%, las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti C1Inh RII (Sanquin Blood Supply Foundation, The Netherlands) o con el anticuerpo policlonal IgG anti C1s humano desarrollado en cabra (Merck, Darmstadt, Germany).

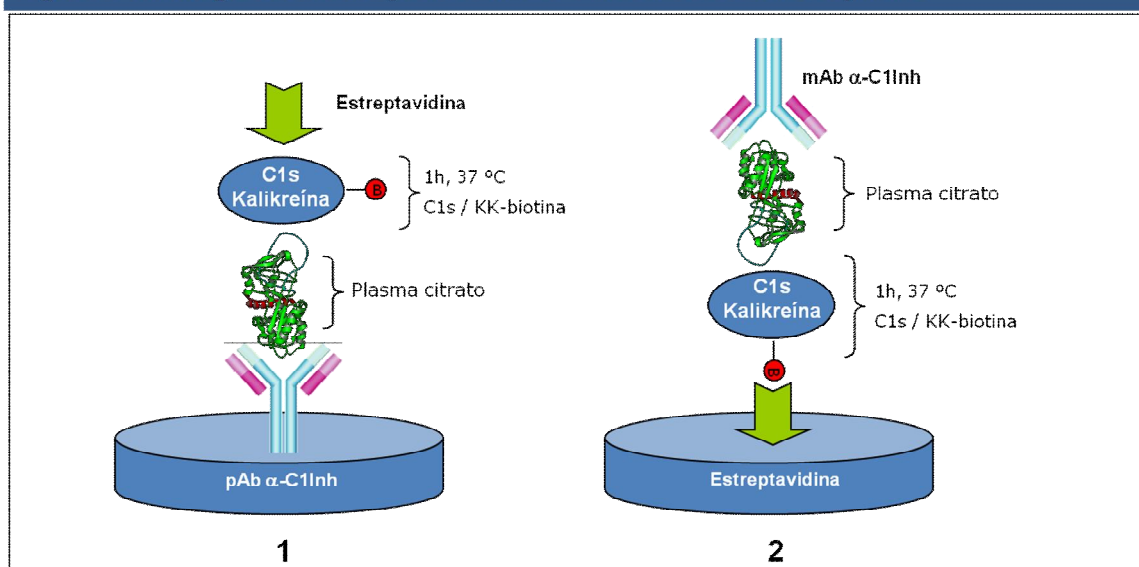
De forma análoga, la interacción con kalikreína se estudió en western blot, utilizando el anticuerpo monoclonal RII o kalikreína humana (Enzyme Research, Swansea, UK), biotinada en nuestro laboratorio.

Los ensayos de ELISA se llevaron a cabo empleando dos estrategias distintas con objeto de cuantificar la capacidad de C1Inh plasmático para formar complejos estables con proteasas (**Fig.6**).

En la estrategia 1 o directa, se utilizaron placas de 96 pocillos Costar 3590 High Binding (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) adsorbidas durante una noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti C1Inh humano A0253 desarrollado en conejo (Dako, Glostrup, Denmark). Posteriormente, las muestras de plasma de pacientes y controles, diluidas 1:50, 1:100, 1:500 y 1:2.500 en una solución de PBS con leche desnatada al 2%, se incubaron en las placas durante una hora a 37°C.

Tras esta incubación, se añadieron diluciones 1:1.000 de cada proteasa (C1s o kalikreína) biotinada. Los complejos C1Inh-proteasa se detectaron usando poli-peroxidasa de rábano (Poli-HRP) conjugada con estreptavidina a una dilución 1:1.000. La reacción se desarrolló con el sustrato tetrametilbenzimidina (TMB) y se detuvo con H₂SO₄ 200 mM, leyendo la absorbancia a 450 nm.

Figura 6. Estrategias de ELISA para el análisis funcional del C1Inh en plasma



Para analizar la funcionalidad del C1Inh en el plasma de los pacientes, se emplearon dos estrategias de ELISA diferentes. En la estrategia **1**, las placas de ELISA recubiertas de anticuerpo policlonal anti C1Inh, se incubaron inicialmente con plasma del paciente (1h, 37°C), tras lo cual, se añadieron soluciones de proteasas biotinadas. Finalmente, los complejos formados, se cuantificaron con poli-HRP estreptavidina. Mediante esta estrategia, se pretendía valorar la capacidad del C1Inh para formar complejos *de novo* con sus proteasas diana. La estrategia **2** (o inversa) se utilizó como validación de la estrategia anterior. En este caso, placas recubiertas con estreptavidina, se incubaron en primer lugar con proteasas biotinadas y, posteriormente, con plasma del paciente, detectando los complejos C1Inh-proteasa, con un anticuerpo monoclonal anti C1Inh.

Todos los ensayos de ELISA según la estrategia 1 (tanto para C1s como para kalikreína), se confirmaron en ELISAs adicionales con un diseño inverso al anterior (estrategia 2, **Fig.6**). En estos ensayos, cada proteasa biotinada se incubó inicialmente

en placas cubiertas de estreptavidina (Pierce, Rockford, IL). Tras añadir diluciones de plasma de pacientes y controles, los complejos proteasa/C1Inh se detectaron utilizando el anticuerpo monoclonal anti C1Inh humano sc-59477 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) como anticuerpo primario y el anticuerpo policlonal anti IgG + IgM de ratón marcado con HRP (Biosource, Camarillo, CA), como anticuerpo secundario. Todas las proteínas biotinadas se prepararon utilizando el reactivo EZ-Link[®] Sulfo-NHS-S-Biotin (Pierce, Rockford, IL) y siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

Además, los complejos C1Inh/proteasa se cuantificaron también en sobrenadantes de cultivos de células Cos-7 transfectadas de forma estable en ensayos de ELISA. Muestras de C1Inh purificado (20 ng) a partir de los sobrenadantes de cultivo de células Cos-7 se diluyeron 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en PBS con leche desnatada al 2% y se añadieron a placas de 96 pocillos Costar 3590 High Binding, previamente adsorbidas con 1 µg/pocillo de anticuerpo policlonal anti C1Inh humano A0253 desarrollado en conejo (Dako, Glostrup, Denmark). Los complejos serpina-proteasas se detectaron según la estrategia 1, descrita para los ensayos funcionales en plasma.

En todos los casos, se hicieron al menos cuatro réplicas de cada ensayo funcional y se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante ANOVA de una vía y test de Bonferroni a posteriori para comparaciones múltiples.

5.10 Análisis conformacional de C1Inh

La cuantificación de las formas cortada y acomplexada/latente de C1Inh en el plasma de los pacientes, se hizo mediante ELISA utilizando los anticuerpos monoclonales específicos de conformación KII y KOK12, previamente descritos (Nuijens et al, 1987). El anticuerpo KII reconoce un neoepítipo creado tras el corte e inactivación de C1Inh por sus proteasas diana, mientras que el anticuerpo KOK12 reacciona con un epítipo conformacional presente tanto en la forma cortada de C1Inh como en las formas acomplexada y latente. De esta manera, mediante el uso combinado de estos anticuerpos, pueden distinguirse los cambios conformacionales que implican corte proteolítico del centro activo, de aquellos en los que éste permanece intacto. Las muestras de plasma de pacientes y controles sanos, diluidas 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:8.000 y 1:16.000, se añadieron a las placas y se incubaron durante 1 hora a

temperatura ambiente. Las formas cortada y acomplejada/latente se cuantificaron empleando los anticuerpos KII y KOK12 biotinados y diluidos 1:500. Ambos experimentos se desarrollaron como se ha descrito para los ensayos funcionales con proteasas del plasma.

5.11 Cultivo de monocitos

Para la cuantificación de la actividad 20S del proteasoma, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) totales mediante centrifugación en gradiente de densidad (HistoPaque 1077, Sigma-Aldrich, Madrid, España), a partir de 50 mL de sangre periférica del paciente GZ, portador de la mutación Arg378Cys en homocigosis (dos extracciones independientes) y de tres controles sanos, diluidos 1:1 en medio tamponado Hanks (Invitrogen).

Los cultivos de monocitos primarios se llevaron a cabo en medio RPMI 1640, suplementado con un 10% (v/v) de Suero Bovino Fetal (SBF) descomplementado y antibióticos (100U/mL penicilina y 100µg/ml estreptomicina), a 37°C y en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Tras 7 días de cultivo, se obtuvieron poblaciones homogéneas de macrófagos que fueron estimuladas durante 48 horas con interferon γ (IFN- γ , 250UI/mL).

5.12 Lisado de células y cuantificación de la actividad del proteasoma

Los macrófagos estimulados y sus correspondientes controles no estimulados se extrajeron de los frascos de cultivo de 25 cm² (Corning Inc. NY) mediante raspado, se lavaron dos veces con PBS a 4°C y se separaron en alícuotas de $0,5 \times 10^6$ células. Tras centrifugarlos y eliminar completamente el PBS, los precipitados de células se incubaron en hielo durante 30 minutos con 100 µl de tampón de lisis (50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl and 1% Triton X-100), agitando con vórtex a intervalos de 10 minutos. Los lisados se centrifugaron durante 20 minutos a 15.000 rpm y 4°C y los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -80°C.

La actividad tipo quimiotripsina del proteasoma 20S se cuantificó por duplicado en cada extracción en unidades de fluorescencia relativa (RFU) con el sustrato

fluorescente LLVY-AMC (Chemicon International, MA, USA). Para ello, muestras de 50 µl procedentes de lisados de monocitos del paciente GZ y de tres controles sanos, se incubaron con el sustrato durante 1 hora a 37°C según las especificaciones del kit y se cuantificó la fluorescencia derivada del AMC libre a 380/460 nm en un fluorímetro Synergy 4 (Bio Tek Instruments, Winooski, VT)

5.13 Análisis y predicción de sitios de *splicing in-silico*.

Para la predicción de sitios crípticos de *splicing* se utilizó el programa Splice Site Prediction by Neural Network (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) del Berkeley Drosophila Genome Project.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN DEL C1 INHIBIDOR.

Para el análisis de mutaciones en el gen *C1NH* se llevó a cabo un cribado, mediante PCR y secuenciación, de los 8 exones, las regiones intrónicas adyacentes y el promotor del gen, en el ADN genómico de pacientes y controles. En los pacientes en los que no se encontró ninguna alteración causante de AEH clínico, se estudió la dosis génica en el locus *C1NH* mediante la técnica de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

De este modo, hemos identificado un total de 51 mutaciones distintas en los pacientes de AEH de tipos I y II: 25 sustituciones que producen cambio de aminoácido, 12 mutaciones que alteran el marco de lectura e introducen un codón de terminación prematuro, 7 defectos de *splicing*, 4 grandes deleciones (que eliminan uno o varios exones) y 3 deleciones que no cambian el marco de lectura (**Figura 7**). Gran parte de las mutaciones de nuestra serie (27; 53%) no habían sido descritas previamente. Además, se ha podido confirmar que 10 mutaciones (18%), encontradas en pacientes en los que no existe historia familiar de AEH, son alteraciones *de novo*. En 5 familias con miembros afectados de AEH y que presentaban deficiencia de C1Inh, no hemos encontrado ninguna alteración en el gen *C1NH*.

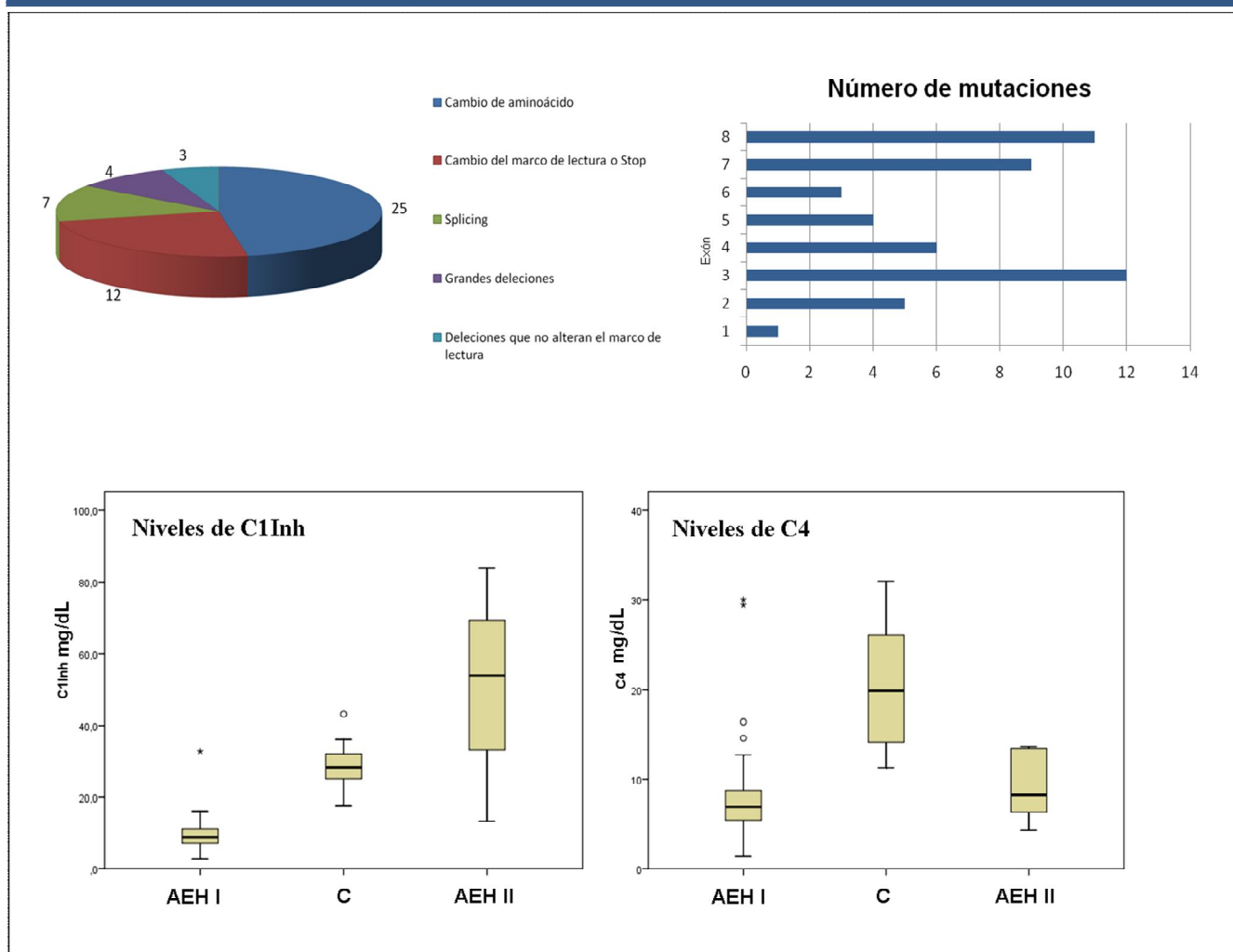
Nuestros resultados muestran una alta diversidad de alteraciones y una distribución homogénea de todas ellas a lo largo del gen. La mayor parte de las familias de la serie (50/63; 79%) presenta mutaciones de AEH tipo I, mientras que solo el 11% (7/63), tiene mutaciones de tipo II, todas ellas localizadas en la arginina 444 del centro activo.

Además, hemos encontrado una mutación (paciente GI, c.1331T>C (Leu425Pro)), que no había sido descrita con anterioridad y que produce un fenotipo intermedio, combinando bajos niveles y una funcionalidad alterada de C1Inh.

Esta distribución de los fenotipos I y II se ajusta a las que se han descrito previamente (**apartado 1.1**). Se ha podido confirmar la presencia de dos “puntos calientes” de mutación en *C1NH*, situados en los exones 3 y 8, que son responsables de tres alteraciones recurrentes previamente descritas: c.1396C>T (Arg444Cys), c.1397G>A (Arg444His) y c.550G>A (Gly162Arg y defecto de *splicing*).

Por último, en este trabajo se ha identificado en un paciente de AEH tipo I (paciente GZ), la mutación Arg378Cys en homocigosis. Debido a la baja frecuencia de individuos portadores de mutaciones en homocigosis en el gen *C1NH* y al escaso conocimiento que existe del perfil de complemento en estos pacientes, todos los miembros de la familia GZ fueron objeto de un estudio clínico, bioquímico y funcional. Los resultados de este estudio se comentarán en el **apartado 7**.

Figura 7. Análisis de mutaciones en el gen *C1NH*



En la parte superior de la figura, aparecen representadas, a modo de esquema, la frecuencia de los distintos tipos de mutaciones identificadas y la distribución de mutaciones en cada exón. Las gráficas de cajas y bigotes de la parte inferior, muestran la concentración de C1Inh y C4, principales valores diagnósticos en el AEH, en nuestra serie de pacientes (AEH I y AEH II) y en la población analizada.

6.1 Mutaciones que producen un cambio de aminoácido

Tabla 2. Mutaciones que producen un cambio de aminoácido

Paciente	AEH	Exón afectado	Mutación		Referencia	De novo
			c.ADN	Proteína		
DX	I	2	c.1A>G	Met-22Val	Göbwein et al, 2008	Si
HJ	I	3	c.434C>A	Ala123Asp	-	No
IH	I	3	c.461A>G	Tyr132Cys	-	n.d.
IF	I	3	c.536>T	Thr157Ser	-	n.d.
EQ	I	3	c.548T>C	Leu161Pro	-	No
FD	I	4	c.595T>A	Tyr177Asn	Roche et al, 2005 b	No
FF	I	4	c.614C>G	Cys183Ser	Zuraw et al, 2000	Si
FW	I	4	c.614G>A	Cys183Tyr	Zuraw et al, 2000	n.d.
GB	I	4	c.671T>G	Ile202Ser	Roche et al, 2005 b	No
FB	I	5	C.689T>C	Leu208Pro	-	No
GO	I	6	c.1048T>C	Ser328Pro	-	No
GX	I	6	c.974T>C	Met303Thr	Verpy et al, 1996	No
GM	I	7	c.1033G>A	Gly323Arg	Roche et al, 2005 b	No
DZ	I	7	c.1070T>A	Ile335Asn	Pappalardo et al, 2008	No
HK	I	7	c.1129>T>C	Ser355Pro	-	n.d.
EV	I	7	c.1196C>T	Pro377Leu	Roche et al, 2005 b	Si
GZ	I	7	c.1198C>T	Arg378Cys	Göbwein et al, 2008	No
HQ	I	8	c.1283G>A	Cys406Tyr	-	n.d.
HS	I	8	c.1283G>A	Cys406Tyr	-	No
GI	I/II	8	c.1331T>C	Leu425Pro	-	No
FT	II	8	c.1396C>G	Arg444Gly	Göbwein et al, 2008	n.d.
GY	II	8	c.1396C>T	Arg444Cys	Skriver et al, 1989	No
HI	II	8	c.1396C>T	Arg444Cys	Skriver et al, 1989	Si
ID	II	8	c.1396C>T	Arg444Cys	Skriver et al, 1989	No
IK	II	8	c.1396C>T	Arg444Cys	Skriver et al, 1989	No
FK	II	8	c.1397G>A	Arg444His	Skriver et al, 1989	No
HC	II	8	c.1397G>A	Arg444His	Skriver et al, 1989	n.d.
FS	I	8	c.1466C>G	Pro467Arg	Verpy et al, 1995	No
FQ	I	8	c.1493C>T	Pro476Thr	-	No
FA	I	8	c.1501G>A	Stop479Arg	Blanch et al, 2002	n.d.

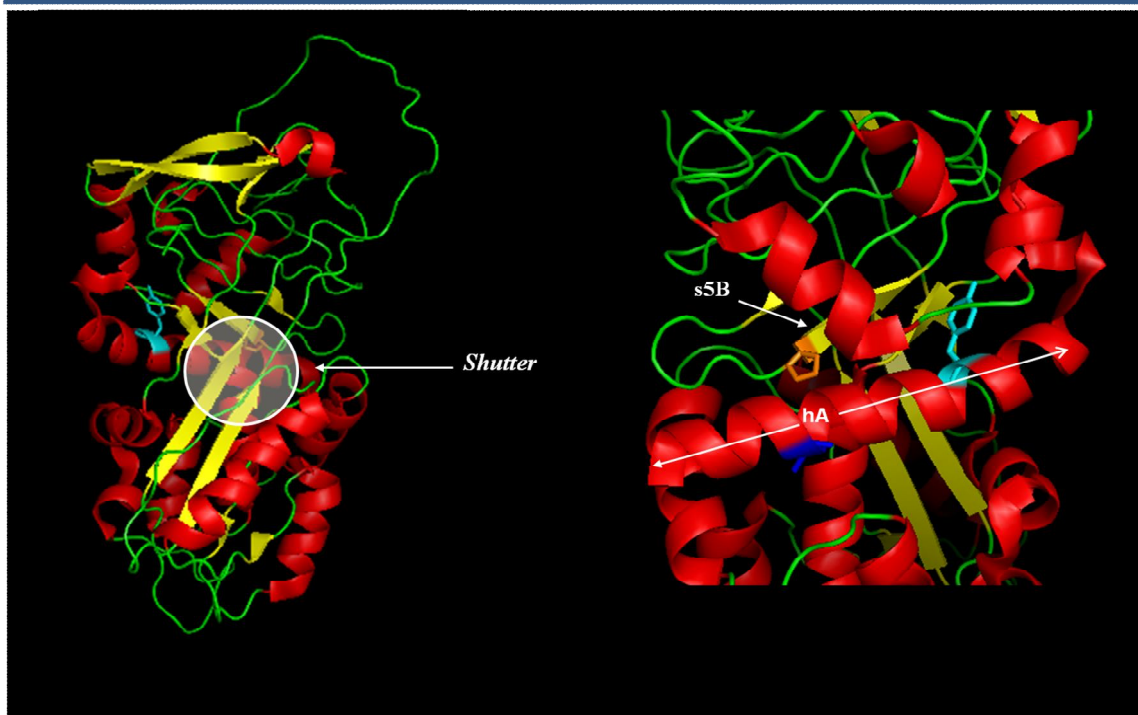
La mayoría de las mutaciones de nuestra serie que implican un cambio de aminoácido se asocian a fenotipos de AEH tipo I (17 de 25, 68%) y están distribuidas a lo largo de todo el gen (**Tabla 2**). Algunas de estas mutaciones afectan a regiones móviles de la proteína, que como se ha comentado en el **apartado 3.2**, participan

activamente en las transiciones conformacionales necesarias para la inhibición de proteasas.

En otros casos, en los que la mutación modifica residuos poco conservados o alejados de las regiones móviles, su carácter patológico se asumió por cosegregar con la enfermedad en las familias afectadas.

Las mutaciones Ala123Asp (paciente HJ), Tyr132Cys (paciente IH) y Pro467Arg (paciente FS), afectan a la región *shutter* (**Fig.8**). Las alteraciones de secuencia en esta región, que se localiza en el centro de la lámina β A e incluye parte de la hebras s5B y s6B, el inicio de la hélice A y la zona central de las hebras s3A y s5A, son las que más frecuentemente alteran la estructura de C1Inh (**Carrel y Lomas, 2002**). El ejemplo de mutación en la región *shutter* más conocido es quizás el de la variante Siyama de A1AT (Ser53Phe en A1AT), que se asocia con deficiencia plasmática de la proteína y con la formación de inclusiones hepáticas poliméricas. Esta sustitución impide el correcto empaquetamiento de la hélice B bajo la lámina β A y desestabiliza la estructura de la proteína (**Lomas, 2006**).

Figura 8. Mutaciones que producen cambios de aminoácido en la región *Shutter*



Dos vistas perpendiculares del C1Inh en las que se indican las posiciones de las mutaciones de nuestra serie que producen cambios de aminoácido en la región *Shutter*. La imagen de la izquierda muestra la región *Shutter* en el C1Inh nativo. En el lado derecho, aparecen indicadas la hélice α A (con la posición de la Ala123 en color azul oscuro y la Tyr132 en azul claro) y la lámina β s5B (con la Pro467 en color naranja).

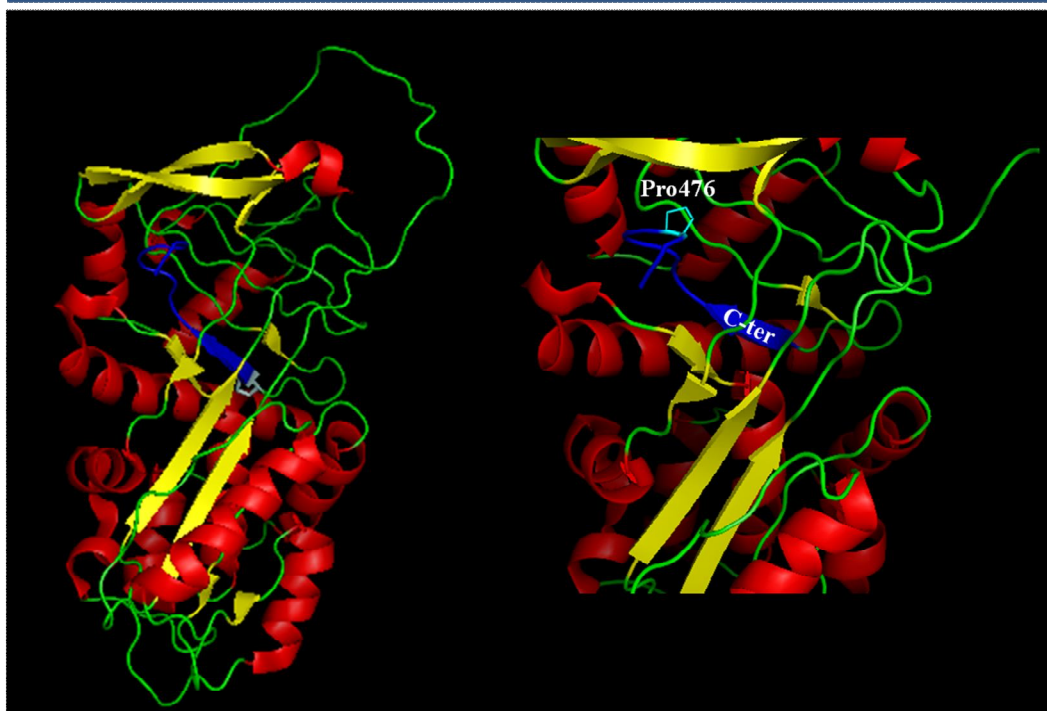
La mutación Pro467Arg produce un cambio apreciable (sustitución de un aminoácido neutro e hidrofóbico por uno básico) en un residuo muy conservado en las serpinas (95% de homología en la familia) (**Irving et al, 2000**). La Pro467 está localizada dentro de un bolsillo hidrofóbico de cinco aminoácidos en la hebra s5B (**Fig.8**) y el cambio en carga e hidrofobicidad debido a esta mutación tiene consecuencias en C1Inh a distintos niveles. Por un lado, estudios en células Cos realizados por Verpy y colaboradores, han demostrado que el C1Inh Pro467Arg sufre graves defectos de secreción y que gran parte de la proteína queda retenida en el retículo endoplásmico. Además, el residuo Pro467 es importante para el reconocimiento de la proteasa C1s, actuando como un sitio de interacción secundaria entre serpina y proteasa (**Verpy et al, 1995; He et al, 1997**).

Las otras dos mutaciones de la región *shutter* que hemos identificado en nuestra serie (y que no habían sido descritas hasta ahora) son los cambios Ala123Asp y Tyr132Cys (**Fig.8**). A pesar de afectar a residuos menos conservados, introducen cambios importantes en la secuencia de aminoácidos. El cambio Ala123Asp sustituye un residuo hidrofóbico y con carga neutra por uno polar y ácido; y la mutación Tyr132Cys introduce una cisteína, que puede formar nuevos enlaces disulfuro (además de los que se establecen entre las cisteínas 101-406 y 108-183). Al modificar el patrón de puentes disulfuro de la molécula, la mutación Tyr123Cys posiblemente impida un plegamiento normal.

Los cambios Pro476Thr y Stop479Arg modifican la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína (**Fig.9**). La Pro476 está conservada en el 95% de las serpinas y se ha demostrado que ciertas mutaciones en este residuo inducen polimerización por sobreinserción del RCL (**Eldering et al, 1995**). En la mutación Stop479Arg (paciente FA), la transversión de timina a adenina en el codón de terminación permite que se sintetice un transcrito de C1Inh más largo de lo normal. La situación parece similar a la de la variante de la hemoglobina *Constant Spring*, causada por una mutación que elonga la transcripción del gen de la $\alpha 2$ globina hasta su región 3' no codificante. Los pacientes portadores de esta variante patológica tienen niveles bajos de hemoglobina circulante por la inestabilidad del ARNm mutante. De forma similar, en el plasma del paciente FA, no se observa ninguna forma de C1Inh de un tamaño mayor

de lo normal (dato no mostrado), por lo que, o bien el ARNm es inestable o la proteína resultante tiene importantes defectos de secreción.

Figura 9. Mutaciones que producen cambios de aminoácido en la región C-terminal



En la figura se indica la posición de las mutaciones de nuestra serie que producen cambios de aminoácido en la región C-terminal (en color azul oscuro) del C1Inh. En la imagen de la derecha, la Pro476 aparece en color azul claro.

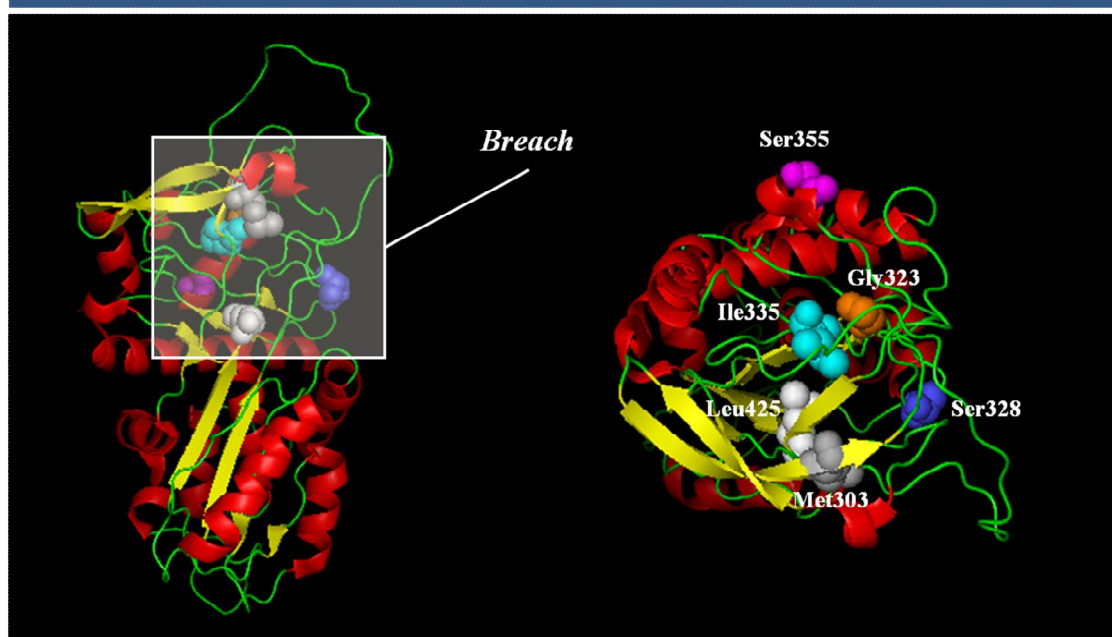
Solo hemos encontrado dos mutaciones que afecten a la región *gate*: Pro377Leu (paciente EV) y Arg378Cys (paciente GZ). La Pro377 es un residuo altamente conservado en el dominio serpina. En A1AT, el residuo equivalente (Pro289) participa en el apilamiento hidrofóbico de la lámina β A, junto con los residuos Phe208, Val218, Met220 y Phe370, que también se encuentran muy conservados (Irving et al, 2000). Posiblemente, el efecto patológico de la mutación Pro377Leu, previamente descrita por Roche y colaboradores esté, por tanto, relacionado con la alteración de este apilamiento de la lámina β (Roche et al, 2005b).

Por sus implicaciones funcionales, la otra mutación de la región *gate*, Arg378Cys, ha sido objeto de un estudio molecular y conformacional, cuyos resultados se discutirán en el apartado 7 de los resultados.

La región *breach* ocupa la parte central de la lámina β A del dominio serpina. Cuatro mutaciones de nuestra serie (Gly323Arg, Ser328Pro, Ile335Asn y Leu425Pro) están distribuidas a lo largo de esta zona y dos más (Met303Thr y Ser355Pro) afectan a residuos menos conservados situados entre las regiones *breach* y *gate* (**Fig.10**).

Los cambios Met303Thr (paciente GX), Gly323Arg (paciente GM) e Ile335Asn (paciente DZ) ya han sido descritos por otros autores. Los residuos afectados están localizados, respectivamente, en las hebras s3C, s2B y s3B, en posiciones en las que las serpinas presentan aminoácidos hidrofóbicos. Las tres mutaciones introducen residuos polares que, potencialmente, pueden modificar la estructura tridimensional (**Pappalardo et al, 2008; Roche et al, 2005b; Verpy et al, 1996**). Además, Roche y colaboradores sugirieron que en C1Inh la sustitución Gly323Arg, aminoácido con una cadena lateral de mayor tamaño podría producir impedimentos estéricos con la Leu374, que se encuentra muy próxima en la estructura terciaria. La mutación del residuo equivalente a la Gly323 en la serpina ATIII (el cambio Leu→Pro) se ha encontrado en pacientes que sufren trombosis recurrentes por deficiencia de esta proteína, haciendo hincapié en la importancia estructural de esta posición del dominio serpina.

Figura 10. Mutaciones que producen cambios de aminoácido en la región *breach*



Vistas frontal y superior del C1Inh. Se indica la posición de la región *breach* y de las distintas mutaciones de la serie que afectan a esta parte de la proteína. Los aminoácidos aparecen representados como esferas de color gris (Met303), naranja (Gly323), azul oscuro (Ser328), azul claro (Ile335) y magenta (Ser355).

Las mutaciones Ser328Pro (paciente GO), Ser355Pro (paciente HK) y Leu425Pro (paciente DZ) no han sido previamente descritas en C1Inh. Todas ellas cosegregan con fenotipos de AEH tipo I dentro de las familias estudiadas, lo que sugiere que tienen también un efecto desestabilizador sobre estructura de la proteína.

Dos de los cambios que hemos identificado (Cys183Ser y Cys406Tyr), eliminan residuos de cisteína implicados en la formación de puentes disulfuro (entre las posiciones 101-406 y 108-183) que conectan los dominios N-terminal y serpina y estabilizan la estructura de C1Inh (**apartado 3.2**). Se ha comprobado que la reducción de estas cisteínas, disminuye la estabilidad de la molécula e induce una conformación latente por auto-inserción del RCL en la hoja β A central (**Simonovic y Patston, 2000**).

El resto de las mutaciones asociadas a AEH de tipo I de nuestra serie afectan a regiones menos conservadas que no participan directamente en las transiciones conformacionales. Entre ellas, hay alteraciones en el péptido señal (Met-22Val) la hélice B (Thr157Ser; Leu161Pro; Tyr177Asn), la hélice C (Leu171Pro) y la hebra s2A (Ile202Asn). Todas estas mutaciones cosegregan con la enfermedad en las distintas familias afectadas, por lo que asumimos que deben alterar significativamente el plegamiento de C1Inh y/o dificultar su secreción.

Un caso de interés es el de la mutación Met-22Val, que elimina el codón de inicio de traducción del gen y la región que codifica el péptido señal de la proteína, alterando tanto el marco de lectura como el transporte de C1Inh hacia la membrana para su secreción.

Entre las 13 mutaciones del exón 8 que producen cambio de aminoácido, tres (Arg444Gly, Arg444Cys y Arg444His) producen un fenotipo de AEH tipo II (niveles normales de proteína circulante pero función disminuida). Todas ellas afectan al residuo P1 del centro activo (Arg444) y no modifican significativamente el plegamiento ni la secreción de C1Inh, pero cambian su especificidad como sustrato, eliminando su función (**Fig.11**).

La Arg444 es considerada un residuo hipermutable (punto caliente de mutación). Se definen como tal, aquellos codones que presenten dos sustituciones distintas en una misma base, o mutaciones que afecten a dos o tres bases distintas (**Cooper y Krawczak, 1990**). En el caso de la Arg444, la alta frecuencia de mutaciones se ve

favorecida por la presencia del dinucleótido CpG en el codón que codifica la arginina (CGC). Se ha estimado que la tasa de transiciones (cambios de purina por purina o de pirimidina por pirimidina) en secuencias CpG es unas veinte veces superior a la del resto del genoma (**Laird y Jaenisch, 1994**).

Figura 11. Mutaciones que producen AEH tipo II



Todas las mutaciones asociadas a fenotipos de AEH tipo II de nuestra serie, afectan a la Arg444 (residuo P1, esferas de color azul claro), situado en el centro del RCL (color azul oscuro).

La hipermutabilidad de los dinucleótidos CpG se debe a la metilación de la citosina en posición 5 (5mC) dentro del dinucleótido. En fase acuosa, el grupo amino de la 5mC puede sufrir hidrólisis espontánea y ser reemplazado por un grupo hidroxilo, lo cual genera un intermedio enólico que estaría en un equilibrio tautomérico desplazado hacia su forma cetónica, que en este caso es la timina.

La mutagénesis mediada por el dinucleótido CpG en el residuo P1 es compatible con dos de las mutaciones de tipo II de nuestra serie (Arg444Cys y Arg444His). En el caso de la mutación Arg444Cys, la transición CGC→TGC habrá tenido lugar en la hebra codificante. En la mutación Arg444His, la transición CGC→CAC habrá ocurrido por la deaminación de la 5mC en la hebra complementaria (GCG→GTG) y habrá quedado fijada en la hebra codificante como CAC (His) tras una ronda de replicación del ADN o por una reparación incorrecta del desapareamiento T≠G a favor de la timina.

Este mismo mecanismo mutagénico se ha asociado también con la recurrencia de sustituciones a Cys e His en el residuo P1 de la ATIII, otro miembro de la familia de las serpinas cuyo centro activo (Arg393) está codificado por un codón CGT (**Skriver et al, 1991**).

Según los estudios funcionales realizados por Eldering y cols. (1992), la mutación Arg444Cys elimina por completo la capacidad de interacción de C1Inh con sus principales proteasas diana (C1s, kalikreína, FXII y plasmina), mientras que la sustitución Arg→His en la posición 444 mantiene cierta actividad residual frente a C1s (posiblemente debido a que el cambio Arg→His puede mantener la carga positiva, considerada esencial para el residuo P1).

La otra mutación de tipo II de nuestra serie (Arg444Gly) es también una alteración recurrente. Sin embargo, no puede explicarse por la deaminación espontánea de dinucleótidos CpG. Por lo tanto, deben existir otros mecanismos adicionales implicados en la hipermutabilidad del residuo Arg444.

Por otra parte, hemos identificado una mutación (Leu425Pro; paciente GI) no descrita previamente, que se asocia con un fenotipo intermedio entre los tipos I y II. En el angioedema hereditario, se clasifican como fenotipos intermedios, aquellos en los que se combinan niveles de proteína ligeramente disminuidos con una funcionalidad baja. En el caso del paciente GI, la concentración de C1Inh era de 11,6 mg/dL (rango de normalidad 14-35 mg/dL) y su funcionalidad de solo un 15% (rango de normalidad 70-130%). El residuo Leu425 está situado en la zona C-terminal de la lámina β S5A, en una posición enfrentada y muy próxima a los residuos Lys380 y Val381 de la lámina S6A (**Fig.4**). Aunque la sustitución por Pro no modifica la carga del residuo, posiblemente la desaparición de la cadena lateral de la Leu modifique ligeramente el plegamiento de esta zona, así como sus posibles contactos laterales con la lámina S6A, dificultando tanto la secreción de la proteína, como su capacidad de sufrir transiciones conformacionales correctas tras su interacción con proteasas.

6.2 Inserciones y deleciones que no alteran el marco de lectura

Hemos identificado tres mutaciones distintas en el exón 5, dos de las cuales no habían sido previamente descritas. Estas mutaciones suponen la inserción o deleción de un aminoácido sin alterar el marco de lectura (**Tabla 3**).

Tabla 3. Inserciones y deleciones que no alteran el marco de lectura

<i>Paciente</i>	<i>AEH</i>	<i>Exón</i>	<i>Mutación</i>		<i>Referencia</i>	<i>De novo</i>
		<i>afectado</i>	<i>cADN</i>	<i>Proteína</i>		
HM	I	5	c.785_787delTCA	Ile240del	-	No
GT	I	5	c.813_815delCAA	delAsn250	Verpy et al, 1996	n.d.
IA	I	5	c.870_871insCTC	Leu268_Asn269insLeu	-	Si

La deleción de las posiciones c.813_815 del cADN (mutación del paciente GT) ha sido descrita por Verpy y colaboradores (1996). Teniendo en cuenta el contexto genómico en el que tiene lugar esta deleción (tres repeticiones en tándem del trinucleótido CAA), el mecanismo mutagénico más probable es el apareamiento incorrecto por deslizamiento (Kroutil et al, 1996; Streisinger et al, 1966).

Durante la replicación del ADN en regiones repetitivas del genoma, la hebra de nueva síntesis puede separarse momentáneamente de la hebra molde y deslizarse cierto número de bases para volver a aparearse en una posición incorrecta corriente abajo, gracias a la repetición de secuencias idénticas. En tales condiciones, si continúa la incorporación de nucleótidos por la ADN polimerasa, se sintetizará una nueva hebra que habrá perdido parte de las secuencias repetidas. En el caso del paciente GT, al estar formada la secuencia repetitiva por trinucleótidos en fase con el marco de lectura, la deleción de un trinucleótido supone la pérdida de un aminoácido (Asn250) pero no afecta al resto de la proteína.

La otra deleción encontrada en el paciente HM (c.785_787delTCA) también afecta a nucleótidos que se encuentran dentro de una repetición corta (trinucleótido TCA).

6.3 Mutaciones que alteran el marco de lectura o introducen un codón Stop prematuro.

Las mutaciones que desplazan el marco de lectura y que introducen un codón Stop prematuro, dan lugar a transcritos truncados que son generalmente eliminados por los mecanismos de control de calidad del ARNm de la célula. En nuestra serie de pacientes, la gran mayoría de las mutaciones que alteran el marco de lectura están localizadas dentro de secuencias repetidas que afectan a dos o más nucleótidos (Tabla 4). Por lo

tanto, el mecanismo mutagénico más probable es el de apareamiento incorrecto por deslizamiento, comentado en el apartado anterior.

Tabla 4. Mutaciones que alteran el marco de lectura o introducen un codón Stop prematuro.

<i>Paciente</i>	<i>AEH</i>	<i>Exón afectado</i>	<i>Mutación</i>		<i>Referencia</i>	<i>De novo</i>
			<i>c.ADN</i>	<i>Proteína</i>		
GU	I	3	c.157dupA	Met31fs	-	No
FU	I	3	c.267delA	Gln67fs	-	No
GQ	I	3	c.267dupA	Gln67fs	-	No
IE	I	3	c.32_33insGC	Thr93fs	-	No
FJ	I	3	c.473C>G	Ser136Stop	-	No
FH	I	3	c.535_536insA	Leu156fs	-	No
HF	I	3	c.535_536insA	Leu156fs	-	No
GE	I	4	c.669_670delGA	Gln201fs	-	No
FV	I	6	c.918_925del	Lys285fs	-	No
GV	I	7	c.1106delA	Asp369fs	Kalmar et al, 2003	Si
HE	I	8	c.1269T>G	Tyr401Stop	-	Si
GJ	I	8	c.1409_1410del	Val448fs	-	Si
GD	I	8	c.1466_1467insC	Pro467fs	-	Si

6.4 Mutaciones que alteran el proceso de *splicing* del ARN

Las mutaciones que afectan a secuencias canónicas de *splicing* o a regiones cercanas, alterando el proceso de maduración del ARNm, constituyen, según la literatura, entre un 7 y un 12% de los defectos moleculares identificados en el gen *CINH* (Tosi, 1998, Pappalardo et al, 2008). En nuestra serie, este tipo de mutaciones suponen un 13% del total y se distribuyen alrededor de los exones 2, 3 y 7 (Tabla 5). En la mayoría de los casos (6 pacientes), la región afectada es el sitio donador (5'ss) del intrón y solo en un paciente (HW) la mutación está localizada en el sitio aceptor (3'ss del intrón 6). En todos los casos, salvo en la mutación c.51+6T>G, se ha comprobado que estos defectos se traducen en la no inclusión ('*skipping*') del exón más próximo en el ARNm maduro.

Tabla 5. Mutaciones que alteran el splicing

Paciente	AEH	Exón afectado	Mutación		Referencia	De novo
			c.ADN	ARN		
FP	I	2	c.51+3A>G	ΔEx2	Roche et al, 2005 ^b	No
HB	I	2	c.51+6T>G	*	-	No
IG	I	2	c.50_51+6del7	ΔEx2	-	n.d.
FÑ	I	3	c.550G>A (Gly162Arg)	ΔEx3	Verpy et al, 1996	No
IC	I	3	c.550+5G>C	ΔEx3	Roche et al, 2005 ^b	No
HW	I	7	c.1030-1G>C	ΔEx7	-	n.d.
IM	I	7	c.1249+1G>C	ΔEx7	-	n.d.

* En el paciente HB no se detectó ninguna alteración cualitativa del proceso de splicing (Ver apartado 6.4.a y figura 13).

a) Mutaciones que afectan al *splicing* del exón 2.

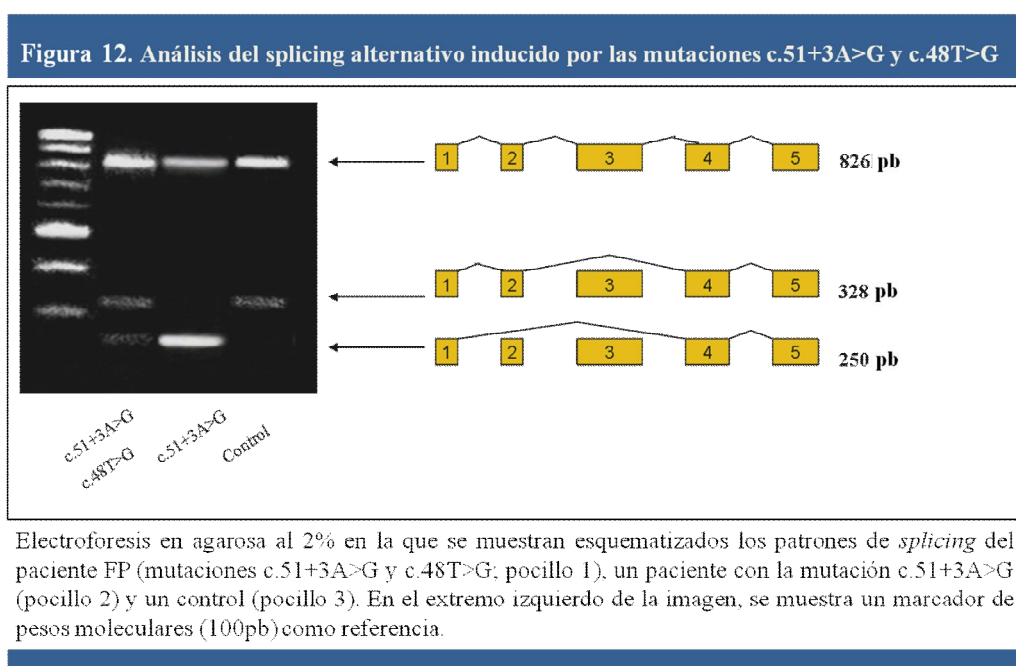
Las tres mutaciones que afectan al *splicing* del exón 2 están localizadas en el sitio donador (5'ss) del intrón 2. Dos de ellas son cambios puntuales en las posiciones conservadas +3 y +6 del intrón (c.51+3A>G y c.51+6T>G) y la tercera es una delección de la última base del exón 2 y las posiciones +1 a +6 del intrón (c.50_51+6del7).

Estos tres cambios alejan la secuencia del sitio donador del consenso y esto se refleja en una marcada reducción del *score* de *splicing* y en la aparición de un sitio donador críptico común (tccgcagGTccgctg) en la posición c.-22, que solapa exactamente con la secuencia del sitio aceptor (3'ss) normal del exón 2 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Los sitios crípticos de *splicing* son secuencias similares y generalmente muy próximas a los sitios habituales (o canónicos) que normalmente no participan en la maduración del ARN. Únicamente se activan y son reconocidos por la maquinaria de *splicing*, cuando se producen mutaciones en el gen por las que se eliminan o modifican las posiciones canónicas (Roca et al, 2003).

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio cualitativo por RT-PCR, este sitio críptico es funcional en los pacientes portadores de las mutaciones c.51+3A>G y c.50_51+5del7. En ambos casos, tal y como cabría esperar, la aparición de un sitio donador corriente arriba del exón 2 se traduce en la no inclusión de este exón en el ARNm maduro. El transcrito resultante pierde el sitio de inicio de traducción normal de *CINH* (c.1 en el cADN de referencia), situado en el exón 2. En esta situación, podría mantenerse el marco de lectura del gen utilizando la metionina en posición p.53 como

primer codón traducido. Sin embargo, la proteína resultante, de 448 aa, habría perdido igualmente el péptido líder, codificado también por el exón 2 y quedaría retenida intracelularmente.

La mutación c.51+3A>G, presente en el paciente FP, ha sido previamente descrita (Roche et al, 2005b). Afecta al sitio donador en una posición no canónica en la que las purinas son predominantes en primates (Senapathy et al, 1990). A pesar de tratarse de una transición (sustitución de purina por purina), la guanina es muy infrecuente en posición +3 (presente en el 24% de los casos) respecto a la adenina (71% de los casos) (Zhang et al, 1998). Además, el paciente FP presenta un segundo cambio en el extremo 3' del exón 2, el polimorfismo c.48T>G. Este cambio no altera la secuencia de aminoácidos y está situado en *cis* respecto a la mutación c.51+3A>G. Mediante RT-PCR abarcando los exones 1 al 5, hemos comprobado que el cambio sinónimo c.48T>G restaura parcialmente el patrón patológico de *splicing* inducido por dicha mutación (Fig.12)

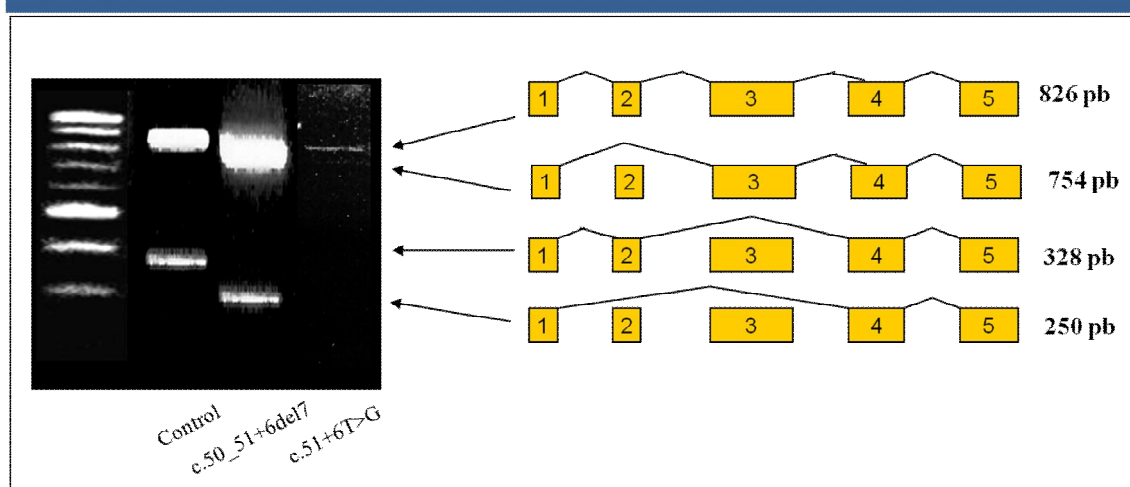


En un paciente portador de la mutación c.51+3A>G, descrito por Roche y colaboradores, se documentó la pérdida completa del transcrito alternativo sin exón 3 (328 pb). En dicho paciente, se observaba una única banda de 250 kb correspondiente al *skipping* conjunto de los exones 2 y 3. Por el contrario, el paciente FP presenta ambos cambios y tiene un patrón de *splicing* similar al de los controles analizados.

Las mutaciones c.50_51+6del7 y c.51+6T>G no han sido previamente descritas. El cambio c.50_51+6del7 puede alterar tanto el procesamiento del ARN, como su traducción a proteína. Por un lado, induce el *skipping* del exón 2 en el ARN maduro (bandas de 754 pb y 250 pb, **Fig 13**); además, altera el marco de lectura del exón 2, introduciendo un codón stop prematuro que generaría, en el transcrito completo (sin *skipping* del exón 2), una proteína truncada de 81aa.

Respecto a la mutación c.51+6T>G, la posición afectada (IVS+6) es ocupada predominantemente en genes humanos por una T (55% de los casos), siendo la G muy poco habitual (solo en un 14%) (**Zhang et al, 1998**). Los análisis del *splicing* mediante RT-PCR en el paciente HB, portador del cambio c.51+6T>G, muestran solo una banda muy tenue correspondiente al transcrito completo con inclusión del exón 2 y no han permitido identificar ningún transcrito de tamaño aberrante.

Figura 13. Análisis del *splicing* alternativo inducido por las mutaciones c.50_51+6del7 y c.51+6T>G



Electroforesis en agarosa al 2% en la que se compara el patrón de *splicing* del exón 2 de controles (pocillo 1) con los patrones patológicos inducidos por las mutaciones c.50_51+6del7 (pocillo 2) y c.51+6T>G (pocillo 3). Marcador de pesos moleculares (100pb) en el extremo izquierdo de la imagen

Dado que solo el alelo no mutado o, en todo caso, el patrón de *splicing* normal, parecen estar expresándose, es probable que el ARN inmaduro procedente del alelo mutado sea inestable. De forma similar, la mutación c.1249+2T>A en el centro donador del intrón 7 descrita por **Kawachi et al (1998)**, produce una reducción del 50% en los niveles de ARNm sin modificar el patrón de *splicing*. Por esta razón, los autores sugirieron que el transcrito mutado debía ser inestable.

En el paciente HB, no hemos encontrado ninguna otra mutación y hemos comprobado que la sustitución c.51+6T>G no está presente en 50 controles y cosegrega con el fenotipo de AEH. Por todo ello, asumimos que tiene un carácter patogénico.

b) Mutaciones que afectan al *splicing* del exón 3

Se han encontrado 2 mutaciones ya descritas que alteran el procesamiento del intrón 3 produciendo su no inclusión en el transcrito maduro. En ambos casos, las mutaciones afectan a guaninas conservadas en la región donadora del intrón 3 (secuencia consenso: AGgta/gagt).

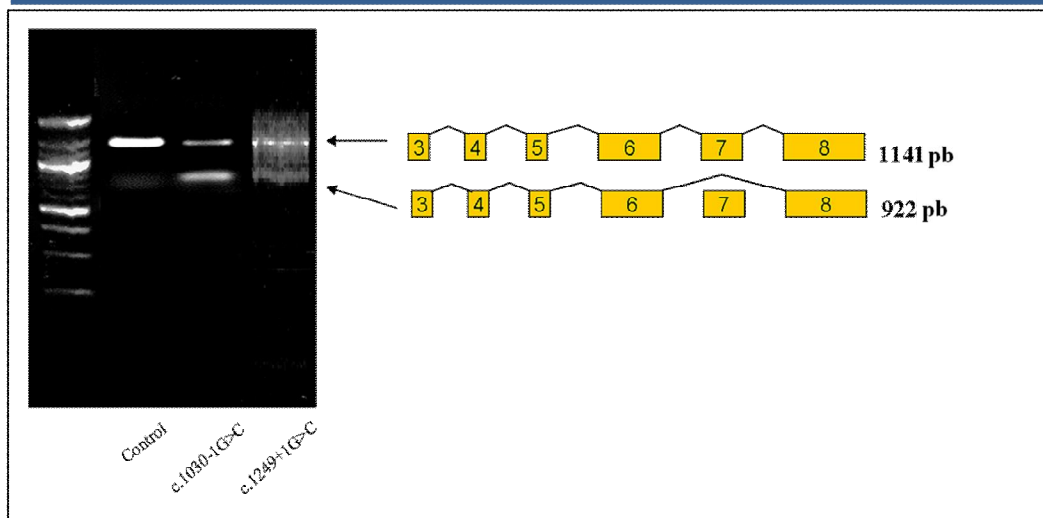
La mutación c.550G>A, presente en la familia FÑ, modifica la última base del exón 3, por lo que puede resultar en un defecto de *splicing* o en la sustitución Gly184Arg. Esta mutación está localizada en un dinucleótido CpG, que, como se comentó en el apartado 6.1, es un punto caliente para transiciones G>A. La mutación c.550G>A se considera una mutación recurrente en *CINH* y el hallazgo de una nueva familia portadora en nuestra serie de pacientes es consistente con la bibliografía (Verpy et al, 1996; Pappalardo et al, 2000; Zuraw y Herschbach, 2000; Roche et al, 2005b).

Por otro lado, el cambio c.550+5G>C se ha encontrado únicamente en el paciente IC. Esta sustitución ha sido previamente descrita en nuestro laboratorio en dos familias españolas no relacionadas (Roche et al, 2005b). Dado que no puede explicarse por ningún mecanismo mutagénico concreto (dinucleótidos CpG, mutación c.550G>A), cabe la posibilidad de que su recurrencia en la población española refleje un efecto fundador.

c) Mutaciones que afectan al *splicing* del exón 7

Los cambios c.1030-1G>C y c.1249+1G>C afectan a posiciones canónicas implicadas en el *splicing* del exón 7. La posición c.1030-1 está situada en el sitio aceptor (3'ss) del intrón 6, mientras que c.1249+1 corresponde al sitio donador (5'ss) del intrón 7. En ambos casos, en la especie humana esas posiciones son ocupadas invariablemente por guaninas (Zhang, 1998), por lo que la sustitución por citosina produce un patrón de *splicing* aberrante.

Figura 14. Análisis del splicing alternativo inducido por las mutaciones c.1030-1G>C y c.1249+1G>C



Electroforesis en agarosa al 2% de los resultados de la RT-PCR de los exones 3 al 8. Se muestra el patrón de splicing de controles (pocillo 1), del paciente HW (portador de la mutación c.1030-1G>C, pocillo 2) y del paciente IM (portador de la mutación c.1249+1G>C, pocillo 3). Marcador de pesos moleculares (100pb) en el extremo izquierdo de la imagen.

La mutación de la guanina en posición c.1249+1, que forma parte del dinucleótido GU al que se une el complejo E del *spliceosoma*, impide el reconocimiento del extremo 5' del intrón. De forma similar, la guanina en c.1030-1 es esencial para la unión y el corte del extremo 3' del intrón por parte de los complejos C1 y C2 del *spliceosoma*. En ambos casos, estas mutaciones reducen el grado de definición del intrón, dificultando su reconocimiento por la maquinaria de *splicing*, lo que se traduce en el *skipping* del exón (Black, 2003; Matlin et al, 2005) (Figura 14).

En la RT-PCR de la mutación c.1249+1G>C, se observan, además de las bandas mayoritarias correspondientes a las formas completa y sin exón 7, varios transcritos adicionales de diferentes tamaños. Aunque estas bandas se han purificado y secuenciado, no se han podido obtener secuencias limpias que permitan determinar su origen preciso, probablemente debido a su baja concentración en relación a los dos transcritos principales. En cualquier caso y teniendo en cuenta el rango de tamaños que presentan, la hipótesis más probable es que estas variantes de *splicing* se generen como resultado del uso de diversos sitios crípticos activados a consecuencia de la pérdida del sitio 5'ss original. En efecto, las regiones intrónicas cercanas al exón 7 contienen al menos dos sitios 5'ss crípticos potenciales que serían compatibles tanto con el *skipping* del exón (secuencia *tttcatggtaaagcc* situada 365pb corriente arriba de la secuencia 5'ss canónica; *score* de *splicing*: 0.89) como con el tamaño de alguno de los transcritos

adicionales que se observan en este paciente (secuencia *tagagggtaggtgc* situada 139 pb corriente abajo; *score* de *splicing*: 0.93).

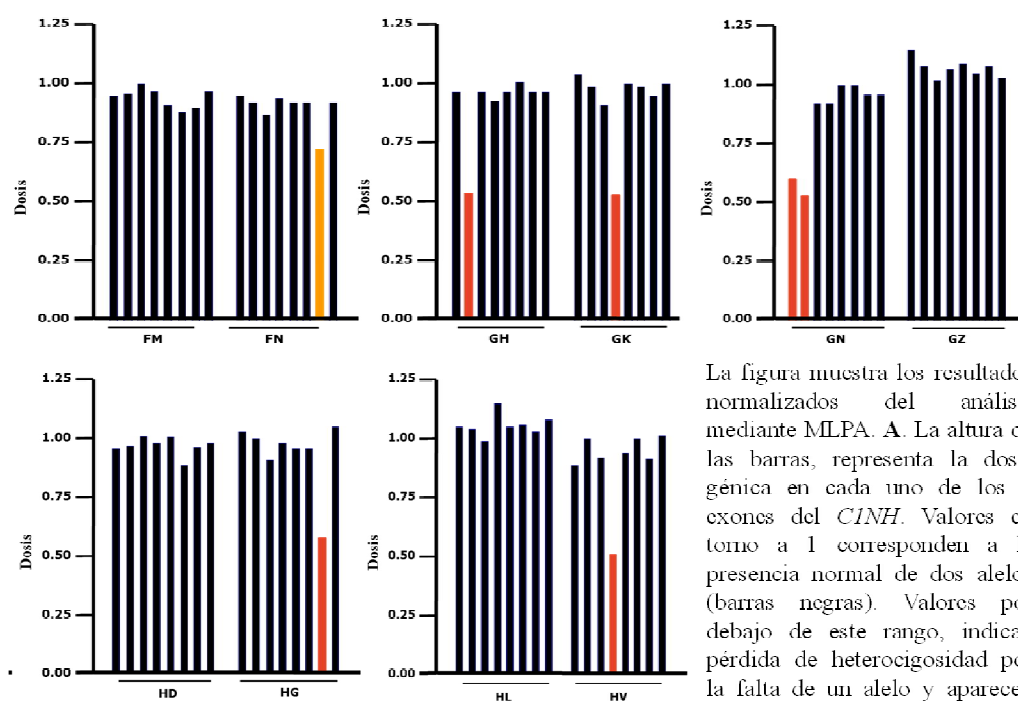
6.5 Grandes deleciones

Debido a la abundancia de secuencias repetitivas *Alu* en los intrones de *C1NH*, en este gen son relativamente frecuentes los eventos de recombinación homóloga desigual durante la meiosis que delecionan uno o varios exones del ADN genómico (**apartado 3.4**).

Las repeticiones *Alu* son elementos móviles evolutivamente relacionadas con el gen que codifica el ARN citoplasmático 7SL. Son particularmente abundantes en el genoma humano (constituyendo en torno a un 10% de su secuencia), debido a su capacidad de retrotransposición (**Iskow et al, 2010; Lander et al, 2001**). Los sucesos de recombinación desigual entre este tipo de secuencias parecen ser una causa común de enfermedad, como demostraron estudios del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) en el caso de la hipercolesterolemia familiar (**Deininger et al, 1999**).

De las 51 mutaciones distintas que hemos identificado en nuestra serie de pacientes, 4 fueron grandes deleciones que afectan a uno o varios exones de *C1NH*. En ninguno de los pacientes estudiados hemos encontrado grandes duplicaciones de uno o varios exones (**Fig.15**).

Figura 15. Análisis de grandes deleciones e inserciones mediante MLPA



Familia	Exón/es delecionados	Nº de pacientes
GH	2	2
GK	4	2
GN	1,2	1 (de novo)
HG	7	1
HV	4	2

La figura muestra los resultados normalizados del análisis mediante MLPA. A. La altura de las barras, representa la dosis génica en cada uno de los 8 exones del *C1NH*. Valores en torno a 1 corresponden a la presencia normal de dos alelos (barras negras). Valores por debajo de este rango, indican pérdida de heterocigosidad por la falta de un alelo y aparecen representadas en color rojo. En uno de los pacientes, el resultado fue indeterminado (barra naranja). El paciente GZ se incluyó en este análisis para descartar una situación de hemicigosis. B. En la tabla de la parte inferior se resumen los datos familiares de los cinco pacientes que presentan grandes deleciones. Los rangos de normalidad se calcularon con el programa Coffalyser v9.4.

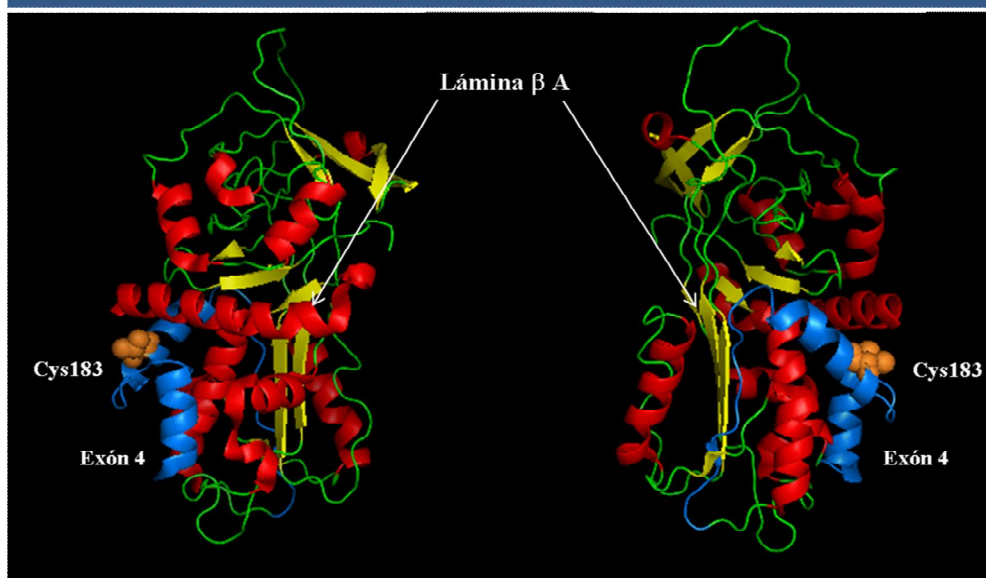
Hemos encontrado dos familias (GK, HV) con deleción del exón 4. Esta alteración resulta singular entre las grandes alteraciones de *C1NH* por varios motivos. Por un lado, la deleción del exón 4 es la más frecuente de todas las grandes deleciones descritas (40%). Probablemente, la acumulación de repeticiones Alu en los intrones 3 y 4, constituidos casi exclusivamente por una sucesión de este tipo de secuencias, podría ser la causa de la alta frecuencia de esta deleción (Carter et al, 1991).

Además, la deleción del exón 4 no altera el marco de lectura del gen, por lo que, teóricamente, el transcrito resultante puede ser traducido y dar lugar a un C1Inh al que le falten 45 aminoácidos internos. En estudios previos de otros autores, se han descrito varias familias en las que se expresa un ARNm estable sin exón 4 en monocitos (Stoppa- Lyonnet et al, 1990). Estudios de expresión *in vitro* en células Cos-7, han demostrado que, si bien la transcripción y la traducción de este ARN tienen lugar de

forma normal, la proteína resultante no puede ser secretada y queda retenida en el aparato de Golgi o en un compartimento asociado (Verpy et al, 1993).

Este último resultado se debe, probablemente, a la desaparición de la Cys183 que, como ya se ha comentado (**apartados 3.2 y 6.1**), conecta los dominios N-terminal y serpina mediante un puente disulfuro con la Cys108 (**Fig.16**). Dada la importancia estructural de este enlace, es probable que la falta de proteína en los pacientes con delección del exón 4 se deba a un plegamiento anómalo de C1Inh.

Figura 16. Región codificada por el exón 4



En estas dos vistas perpendiculares del C1Inh, se indican en color azul las estructuras codificadas por el exón 4 (hélices α C y D y la segunda hebra de la lámina β A) y la Cys183 en color naranja. La conexión con la Cys108 (dominio N-terminal) no es visible en este modelo.

La delección del exón 7 (paciente HG) se ha descrito previamente en varios casos de AEH en los que se ha documentado que abarca en torno a 1,7 kb del ADN genómico (Bowen et al, 2001). Esta delección modifica el marco de lectura del gen, eliminando estructuras esenciales del extremo C-terminal del dominio serpina, como la lámina β S6A y el RCL, siendo incompatible con la síntesis de la proteína.

Las alteraciones de los pacientes GH (delección del exón 2) y GN (delección *de novo* de los exones 1 y 2) afectan al dominio N-terminal. Ambas mutaciones eliminan el péptido líder de la proteína, codificado por los exones 1, 2 y 3 y alteran el marco de

lectura. Por tanto, se trata de mutaciones con un efecto severo sobre la síntesis y secreción de C1Inh.

Estas deleciones no han sido previamente descritas y, a diferencia del resto de grandes alteraciones, parecen deberse a un mecanismo mutagénico que no implica las repeticiones *Alu* (ya que los intrones 1 y 2 no presentan este tipo de secuencias). Al no verse favorecidas por procesos de recombinación no homóloga entre secuencias *Alu*, la delección de estos exones es, probablemente, muy infrecuente.

7. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN ARG378CYS EN HOMOCIGOSIS.

7.1 Descripción clínica y perfil de complemento del paciente GZ.

El paciente GZ es un hombre de 34 años que ha manifestado síntomas de AEH desde la adolescencia. La forma de presentación es principalmente cutánea, con afectación de la cara y extremidades. Ha sufrido, además, varios episodios de edema de glotis con compromiso respiratorio. La frecuencia de los ataques antes del diagnóstico era de aproximadamente 1 ataque al mes con una duración promedio de 4 días.

El estudio bioquímico de las proteínas del complemento en este paciente reveló un perfil de consumo de la vía clásica compatible con el diagnóstico de AEH Tipo I (C4 1,44 mg/dL; C1Inh 4,38 mg/dL; C1Inh funcional 11%). Además, se observó un ligero aumento del componente C3 (141 mg/dL) y ausencia de C1q en suero. No se identificaron procesos linfoproliferativos ni autoanticuerpos anti C1Inh o anti C1q que pudieran asociarse a este perfil de consumo, por lo que se descartó el diagnóstico de angioedema adquirido (AEA).

Como parte del estudio familiar, se analizaron muestras procedentes de cinco familiares asintomáticos. El perfil de complemento mostró que cuatro de ellos cumplían también criterios diagnósticos de AEH tipo II. Sólo la hija del paciente (GZ7, III.1), de tres años de edad, tenía valores de complemento dentro de la normalidad. En la tabla de la **Fig.17**, se resumen los resultados y los valores de referencia de estos estudios.

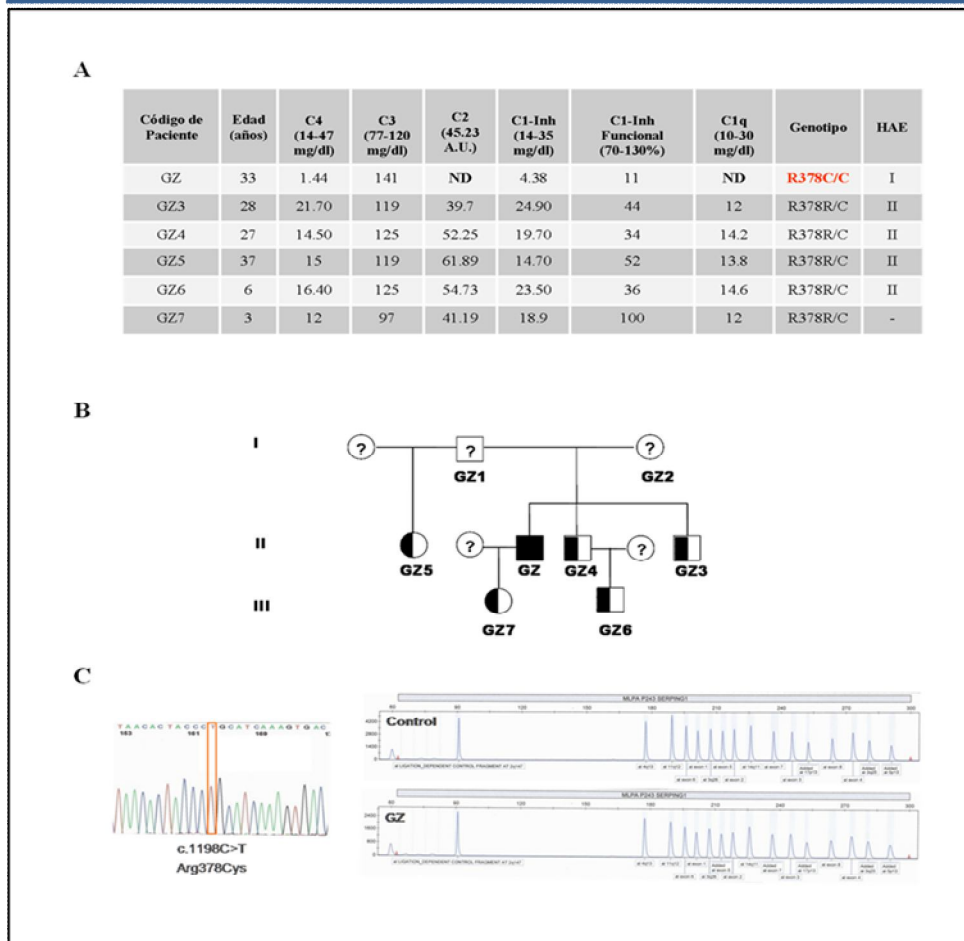
7.2 Seguimiento clínico y bioquímico

Tras ser diagnosticado de AEH, el paciente GZ recibió tratamiento profiláctico con el andrógeno atenuado estanozolol (Winstrol[®], 12mg. cada 12 horas) y la sintomatología remitió completamente. Con objeto de comprobar el efecto del tratamiento con andrógenos atenuados sobre los niveles de proteínas del complemento, se inició un seguimiento clínico y bioquímico del paciente. A lo largo de veintiocho meses se tomaron tres muestras de sangre: en el momento del diagnóstico (Pre-tratamiento), a los 21 meses (Tratamiento 1) y a los 28 meses (Tratamiento 2) del inicio de la toma de estanozolol.

7.3 Estudio genético de la familia GZ.

Como se ha descrito en el apartado 5.5, se analizaron los ocho exones, las regiones intrónicas circundantes y el promotor del gen *C1NH*. El análisis de la secuencia del gen permitió identificar la sustitución homocigota c.1198C>T (Arg378Cys) en el exón 7 del paciente GZ. Todos sus familiares estudiados eran heterocigotos para esta mutación. El estudio mediante MLPA del paciente GZ permitió descartar una posible delección en el locus de *C1NH* y confirmó el genotipo homocigoto (**Fig. 17**).

Figura 17. Estudio bioquímico y genético de la familia GZ.

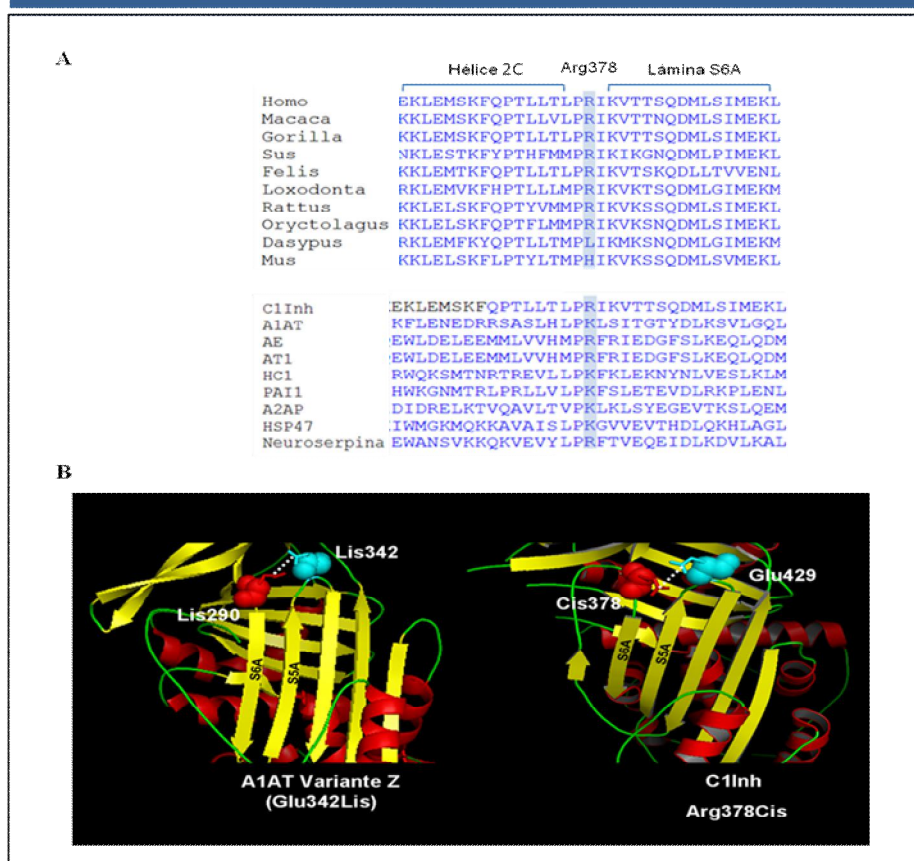


A. Perfil de complemento de la familia GZ. Los valores de referencia de cada medida se muestran entre paréntesis. **B.** Árbol genealógico de la familia y segregación de la mutación c.1198C>T (Arg378Cys). Los miembros que no estuvieron disponibles para el estudio genético se indican con signos de interrogación. **C.** En el lado izquierdo de la imagen, se muestra un electroferograma de la secuencia del paciente GZ, en la que aparece recuadrada la mutación en homocigosis c.1198C>T en el exón 7. Las gráficas del lado derecho, representan los perfiles de MLPA normales de un control sano y del paciente GZ.

7.4 Analogía entre la mutación Arg378Cys de C1Inh y la Z-A1AT

La arginina 378 de C1Inh está situada en la región *gate*, en el giro entre la hélice 2C y la lámina S6A de la hoja β A. Es un residuo polar cargado positivamente que ocupa una región expuesta de la molécula. Se trata de una posición poco conservada entre las serpinas, en la que aparecen tanto argininas como lisinas, aunque presenta una alta conservación entre las secuencias de C1Inh de mamíferos, en las que predomina la arginina. Además, aunque es un residuo poco conservado en la secuencia de aminoácidos entre las serpinas, sí existe, sin embargo, una alta conservación en cuanto a la carga e hidrofobicidad de los aminoácidos (arginina y lisina, residuos polares y con carga positiva) que ocupan esta posición en los distintos miembros de la familia (Fig.18).

Figura 18. Analogía entre la mutación Arg378Cys de C1Inh y la variante Z de A1AT



A. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región *gate* en el C1Inh de distintos géneros de mamíferos (parte superior) y en las serpinas humanas (parte inferior). **B.** Vista perpendicular de la lámina β A de la Z-A1AT en conformación nativa (archivo 1QLP.pdb) y del C1Inh Arg378Cys en conformación latente (archivo 2OAY.pdb). AE: Anti-Elastasa (ovoalbumina); AT1 (Anti-Trombina 1); HCI: Cofactor I de la Herparina; A2AP: Alfa-2-Antiplasmina; HSP47: Heat-Shock-Protein 47.

En la estructura terciaria de C1Inh, la arginina 378 queda enfrentada y a poca distancia del ácido glutámico 429 de la lámina β adyacente (S5A), situado en la base de la región bisagra.

Como se ha comentado en el apartado 3.7 de la introducción, la importancia de la región bisagra ha quedado demostrada en estudios de la variante Z de la serpina A1AT (Z-A1AT). La desaparición del puente salino entre la lisina 290 y el ácido glutámico en posición 342 (región bisagra) por la mutación Glu342Lis en esta variante patológica, reduce la estabilidad de la molécula e induce la formación de polímeros intracelulares insolubles.

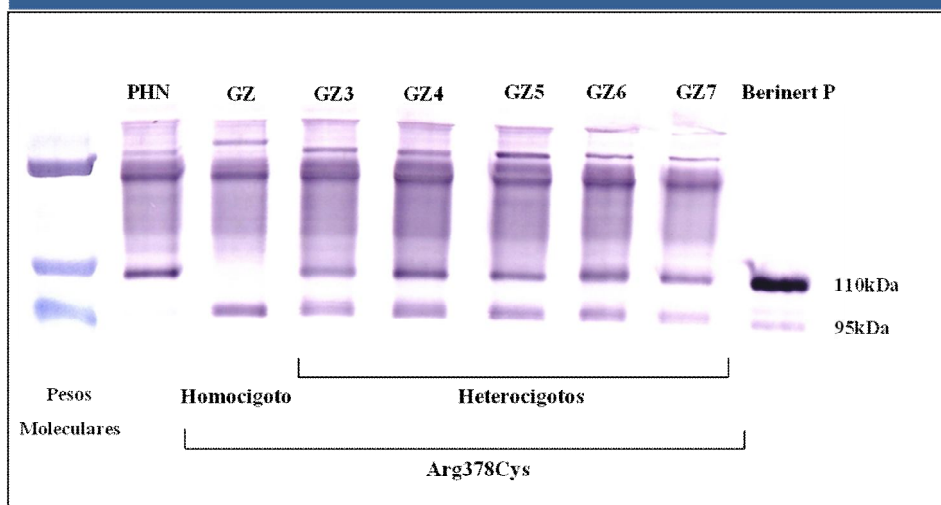
En base a modelos estructurales de C1Inh (archivos 1M6Q.pdb y 2OAY.pdb de Protein Data Bank) y a la comparación de las secuencias de aminoácidos de C1Inh y A1AT, sugerimos que la arginina 378 de C1Inh (homóloga a la lisina 290 de A1AT) forma un puente salino equivalente con el ácido glutámico en posición 429 (**Fig.18**). En el paciente GZ, la arginina con carga positiva es reemplazada por una cisteína neutral en posición 378 y esta sustitución probablemente impide la formación del puente salino.

Por tanto, aunque afectan a residuos diferentes, el efecto predicho sobre la estructura del dominio serpina de la mutación Arg378Cys de C1Inh es análogo al de la sustitución Glu342Lis de la variante Z de A1AT.

7.5 Estudios funcionales de la proteína Arg378Cys

La interacción del C1Inh nativo con sus proteasas diana (**Tabla 1, página 17**) da lugar a la formación de cantidades variables de las formas cortada y latente de C1Inh, ambas con un peso molecular aparente de 96 kDa (**Patston et al, 1995**). Mediante western blot de muestras de plasma fresco, las variantes conformacionales nativa y cortada/latente pueden separarse e identificarse en condiciones desnaturizantes no reductoras (**Fig.19**).

Figura 19. Análisis del C1Inh en plasma mediante western blot en los miembros de la familia GZ



PHN: Plasma Humano Normal; Berinert P: Solución inyectable de C1Inh purificado de plasma para perfusión (CSL Behring).

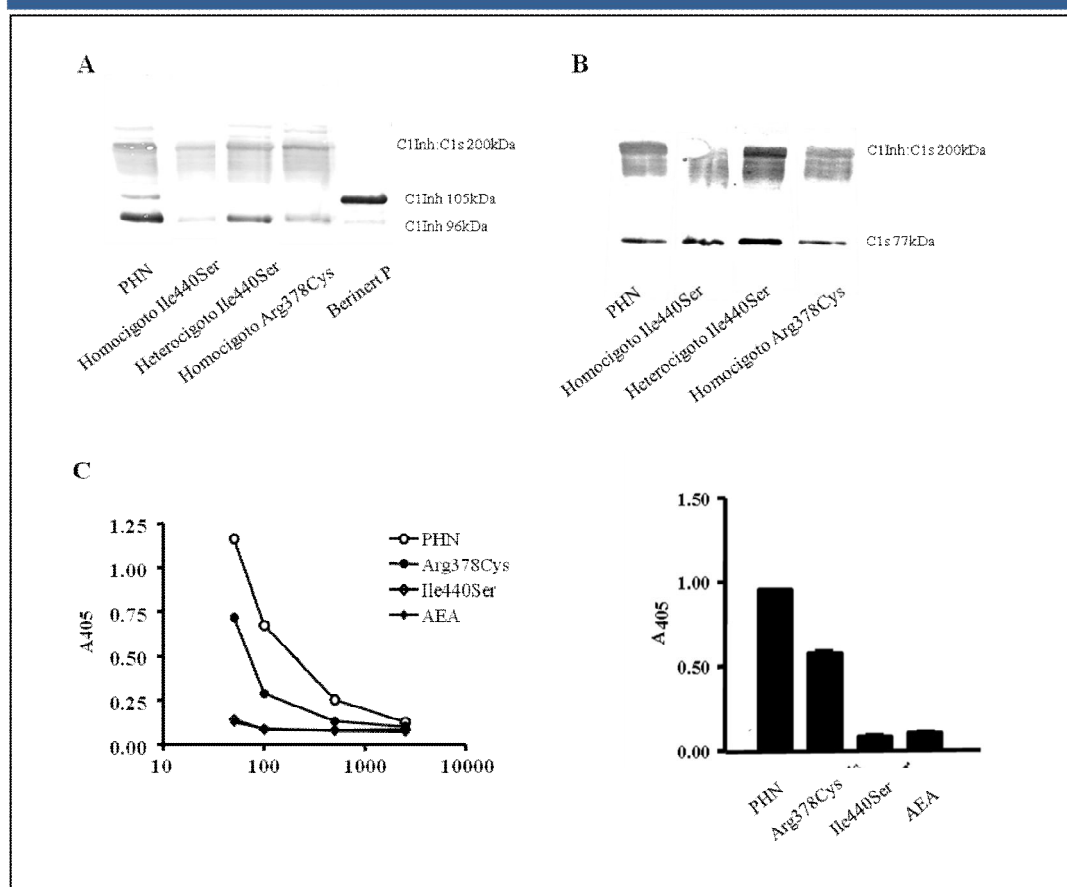
En el caso del paciente GZ, homocigoto para la mutación Arg378Cys y como se ha descrito en los pacientes con mutaciones en homocigosis identificados previamente, el C1Inh plasmático aparece exclusivamente en su forma cortada o latente. Todos los familiares estudiados de GZ, heterocigotos para la mutación Arg378Cys, presentan ambas formas de C1Inh en plasma (**Fig. 19**).

Estos resultados sugerían una pérdida total de actividad por parte del C1Inh Arg378Cys. La ausencia de actividad puede deberse a la interacción con proteasas y al corte del centro activo del dominio serpina, o a que la proteína adopte de forma espontánea una conformación latente. También puede darse una combinación de ambas situaciones, por la cual coexistan en el plasma del paciente las dos formas inactivas (cortada y latente). Teniendo en cuenta la ausencia de C1Inh nativo en el paciente GZ, nos propusimos analizar su funcionalidad cuantificando la capacidad de formar complejos estables con dos de sus principales proteasas diana.

Las muestras de plasma procedentes del paciente GZ, uno de sus familiares heterocigotos (paciente GZ4), un paciente homocigoto para la mutación Ile440Ser (paciente ER), un paciente con angioedema adquirido por autoanticuerpos anti-C1Inh (AAE) y controles sanos (Plasma Humano Normal, PHN), se sometieron a una incubación de 1 hora a 37°C con un exceso molar de cada proteasa. Los complejos inhibidores C1Inh-proteasa se analizaron mediante western blot y se cuantificaron por ELISA, como se ha comentado en el apartado 5.9 de Materiales y Métodos.

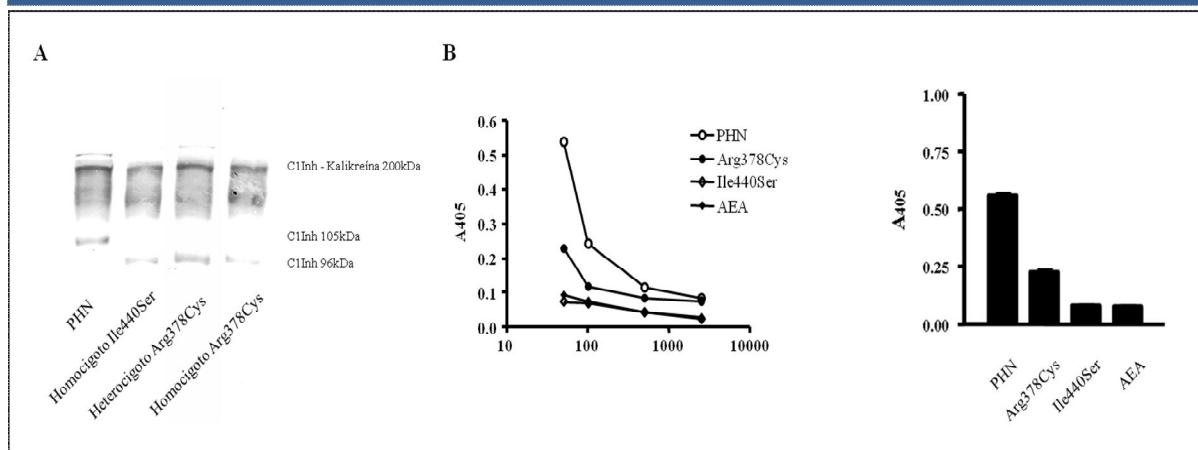
En contra de lo esperado, el C1Inh plasmático con la mutación Arg378Cys mostró una capacidad normal de unión a C1s (en torno a un 80% respecto a la capacidad del PHN), pero marcadamente reducida para interaccionar con kalikreína (aproximadamente un 38%). Tanto en el plasma del paciente homocigoto Ile440Ser como en el del paciente con AAE, los complejos C1Inh-C1s y C1Inh-kalikreína eran casi indetectables (**Figuras 20 y 21**).

Figura 20. Análisis mediante western blot y ELISA de la interacción entre C1Inh y C1s



En la parte superior de la figura se muestra el análisis de la interacción entre C1Inh y C1s mediante western blot con anticuerpos monoclonales anti C1Inh (A) y con anticuerpos monoclonales anti C1s (B). Las bandas de 105 y 96kDa representan las formas libres del C1Inh y la banda de 200kDa corresponde a los complejos C1Inh-C1s. La cuantificación de estos complejos mediante ELISA en los homocigotos para las mutaciones Arg378Cys e Ile440Ser, y en un paciente con deficiencia adquirida de C1Inh (AEA) aparece en la parte inferior de la figura (C).

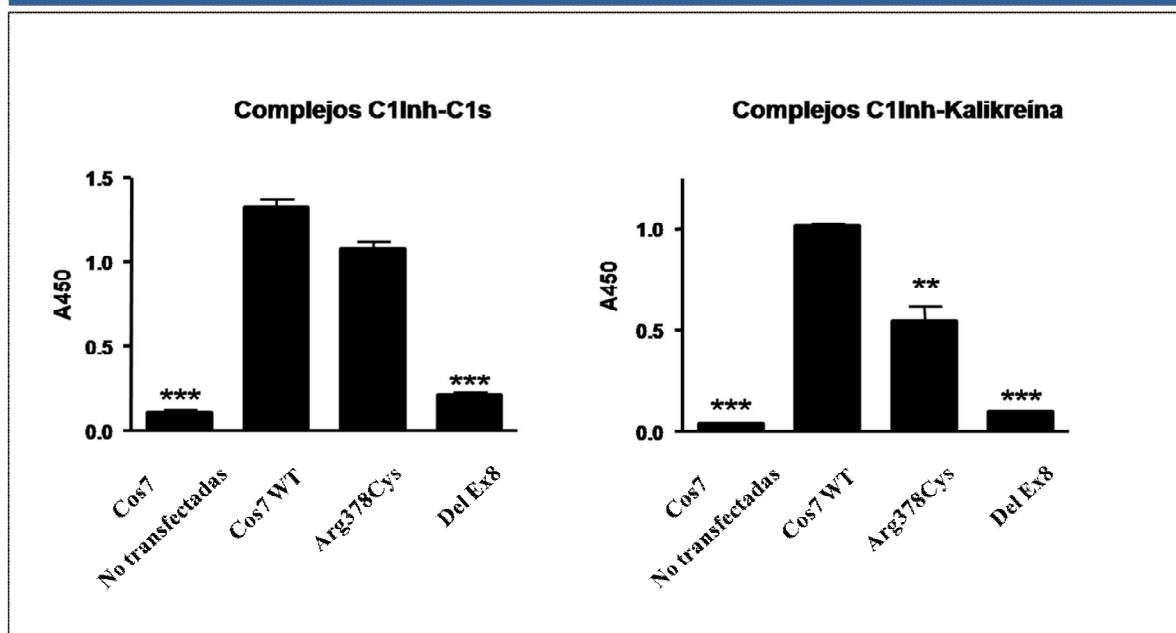
Figura 21. Análisis mediante western blot y ELISA de la interacción entre C1Inh y kalikreína



En la parte izquierda de la figura (A) se muestra el análisis de la interacción entre C1Inh y kalikreína mediante western blot con anticuerpos monoclonales anti C1Inh. Las bandas de 105 y 96kDa representan las formas libres del C1Inh y la banda de en torno a 200kDa corresponde a los complejos C1Inh-kalikreína. (B) Cuantificación de los complejos mediante ELISA en los homocigotos para las mutaciones Arg378Cys e Ile440Ser, y en un paciente con deficiencia adquirida de C1Inh (AEA).

Estos resultados se confirmaron mediante ELISA de sobrenadantes de células Cos-7 transfectadas de forma estable con un minigen de C1Inh portador de la mutación Arg378Cys (**Figura 22**) y en ELISA inversos de muestras de plasma, como se ha descrito en el apartado 5.9.

Figura 22. Análisis de la interacción C1Inh-proteasas en sobrenadantes de células Cos7



Se incluye, como control positivo, un clon de células Cos7 transfectadas con el C1Inh salvaje (Cos7 WT). Como controles negativos, se utilizaron células Cos7 no transfectadas y células Cos7 transfectadas con un C1Inh mutante sin exón 8 (Del Ex8).

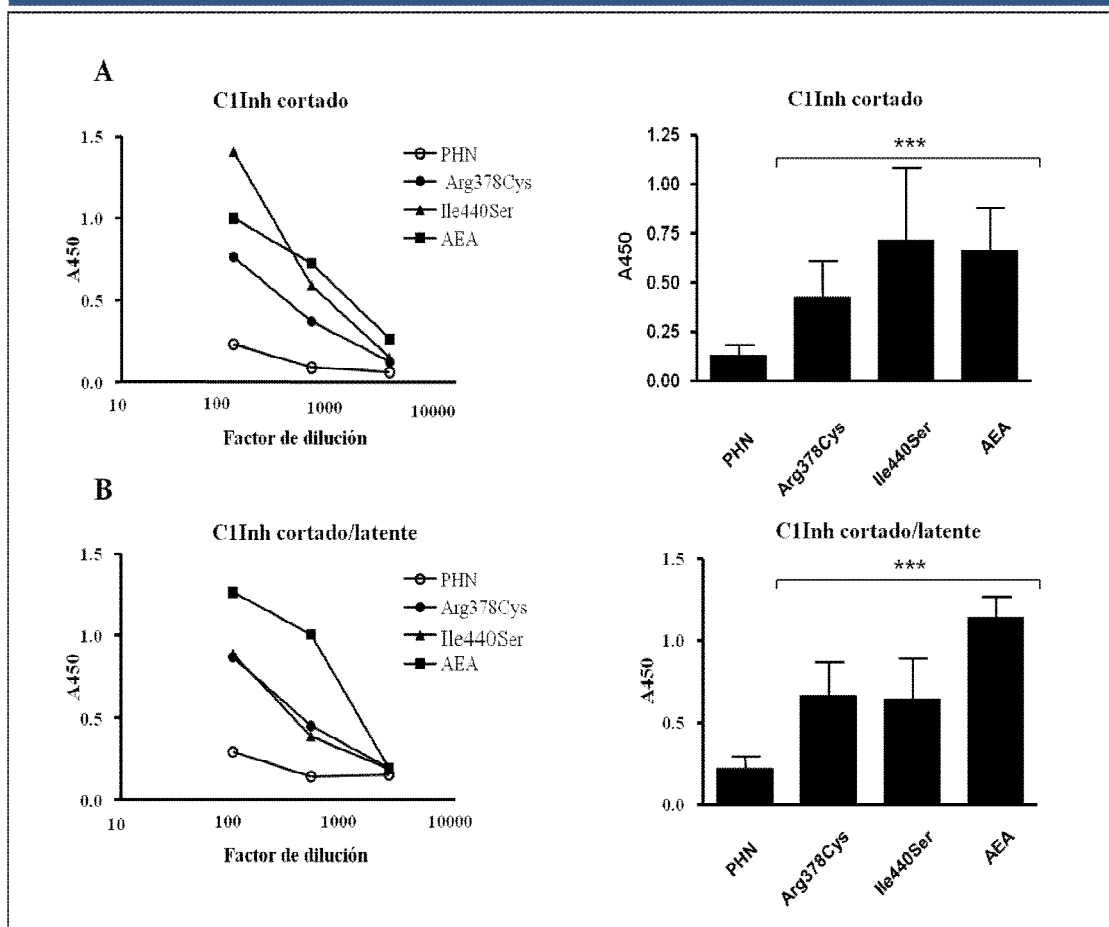
7.6. Estudio conformacional de las mutaciones Arg378Cys e Ile440Ser en plasma.

El hecho de que el C1Inh con la mutación Arg378Cys mantenga una capacidad parcial para interactuar con proteasas, a pesar de la ausencia de C1Inh en conformación nativa en el plasma del paciente GZ, nos llevó a analizar con más detalle el estado conformacional de la proteína.

El corte del centro activo de C1Inh por cualquiera de sus proteasas diana genera un neoepítipo común, que puede detectarse de forma específica con el anticuerpo monoclonal KII. De forma análoga, las formas latentes y/o acomplexadas de C1Inh son reconocidas específicamente por el anticuerpo monoclonal KOK12 (Nuijens et al, 1988). El uso combinado de estos dos anticuerpos permite, por tanto, distinguir estados conformacionales que impliquen corte proteolítico de aquellos en los que se mantiene la integridad de la molécula.

Como se puede observar en la **Figura 23**, la señal del anticuerpo KII en el plasma del paciente GZ es superior a la del PHN y comparable a la obtenida en el homocigoto ER y en el de un paciente de AEA. Un patrón de detección similar se obtuvo cuando el análisis se llevó a cabo con el anticuerpo KOK12.

Figura 23. Estudio conformacional del C1Inh en plasma



Las formas cortada y latente de C1Inh se cuantificaron en muestras de plasma por medio de ELISA con los anticuerpos monoclonales KII (específico para las formas cortada y latente de C1Inh) (A) y KOK12 (específico solo para la conformación latente del C1Inh). AEA: paciente con deficiencia adquirida de C1Inh

Los resultados obtenidos en el paciente ER indican una pérdida completa de actividad de C1Inh debida al corte del centro activo y son coherentes con los análisis funcionales (**Apartado 7.5**). En el caso del paciente GZ y teniendo en cuenta la capacidad de interacción del C1Inh Arg378Cys con C1s, la detección de la proteína por ambos anticuerpos monoclonales sugiere que esta mutación crea un epítipo similar al que aparece en las formas latentes. Dado que el C1Inh plasmático del paciente GZ aparece exclusivamente en su forma de 96kDa en los estudios de western blot, sugerimos que el C1Inh Arg378Cys podría sufrir una inserción parcial del RCL en la hoja β A que permita cierta interacción con proteasas.

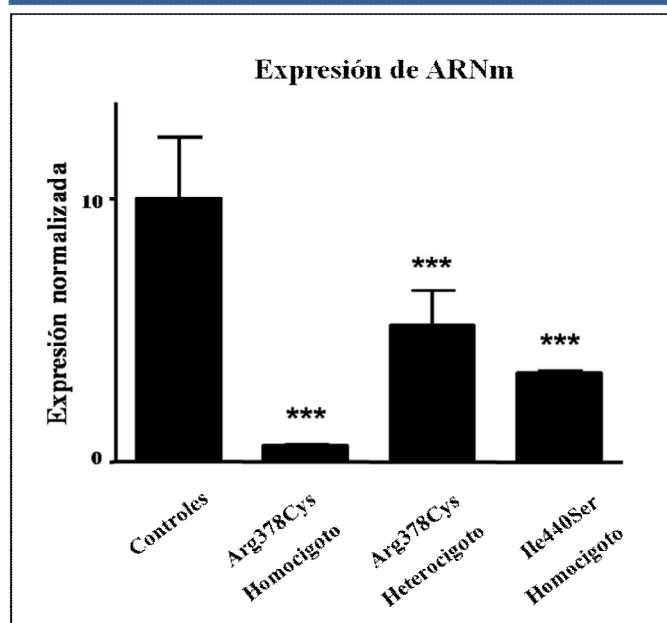
Otra posible explicación de estos resultados sería la presencia simultánea de formas cortadas (inactivas) y no cortadas pero aberrantemente plegadas (y parcialmente funcionales) en el plasma de este paciente.

7.7. Cuantificación de los niveles de ARNm

Los niveles de ARNm de *CINH* se cuantificaron en el paciente GZ, homocigoto para la mutación Arg378Cys, en uno de sus familiares heterocigotos (paciente GZ4) y en uno de los homocigotos para la mutación Ile440Ser (paciente ER). En todos los casos, las muestras de ARN extraídas de CMSPs se obtuvieron en periodos libres de síntomas de angioedema. Una vez normalizados, los resultados obtenidos en pacientes se expresaron como un porcentaje de la media de tres controles sanos.

Tanto los pacientes con mutaciones en homocigosis (GZ y ER), como el paciente heterocigoto (GZ4), mostraron niveles de expresión del gen *CINH* significativamente menores que los de controles sanos. La mutación Arg378Cys en homocigosis parece tener un efecto drástico sobre los niveles de ARNm, siendo estos aproximadamente diez veces menores que los valores control. En el caso de la mutación Ile440Ser en homocigosis, este efecto es más moderado (niveles de expresión en torno al 30% de controles). El heterocigoto GZ4 mostró una tasa de síntesis de ARN de alrededor del 50% de los valores control (**Figura 24**).

Figura 24. Cuantificación del ARNm de *CINH*



La figura representa los niveles normalizados de expresión de ARNm del gen *CINH* en individuo de la familia GZ (homo- y heterocigotos para la mutación Arg378Cys) y en un paciente homocigoto para la mutación Ile440Ser.

Teniendo en cuenta los resultados de los pacientes homocigotos y al tratarse en ambos casos de mutaciones que en los heterocigotos dan lugar a AEH tipo II, sus niveles detectables de C1Inh en plasma (4,38 mg/dL en el paciente GZ y 3,4 mg/dL en el paciente ER) pueden atribuirse a un catabolismo reducido de C1Inh.

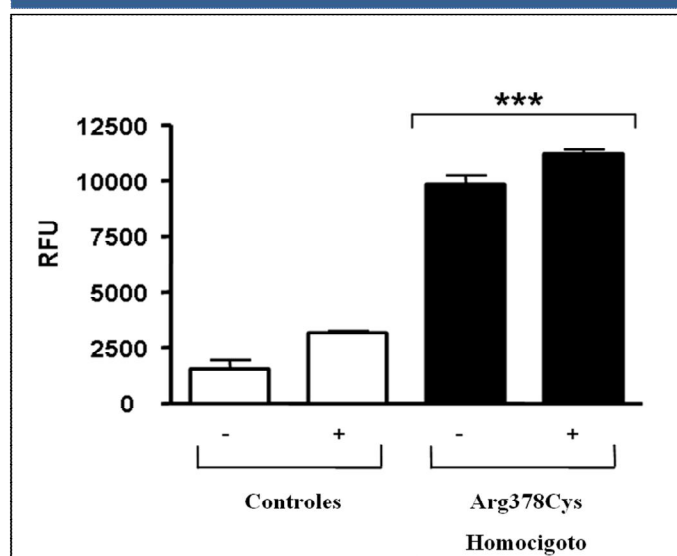
Tal y como se comentó en el apartado 3.6, en los pacientes de AEH tipo II, C1Inh no interacciona de forma eficiente con sus proteasas diana y forma pocos complejos C1Inh-proteasa estables. Las formas intactas de C1Inh (nativa o latente) tienen una larga vida media en el plasma ($t_{1/2}$ = 9,7 h), a diferencia de las formas cortadas y acomplejadas que son rápidamente eliminadas de la circulación ($t_{1/2}$ =6,75 h y 3,08 h, respectivamente) (Malek et al, 1996).

Las causas precisas de estas distintas tasas catabólicas se desconocen, pero se ha postulado que las proteasas inactivadas presentes en los complejos podrían facilitar su reconocimiento y eliminación de la circulación al interaccionar con receptores específicos de proteasa (Perlmutter et al, 1990). Independientemente del mecanismo preciso que medie su menor tasa catabólica, el C1Inh de pacientes de AEH tipo II tiene, de hecho, una mayor vida media en plasma, lo que permite el acúmulo de proteínas afuncionales en la circulación. Este es uno de los factores, junto con las diferentes tasas de síntesis y secreción, que contribuye a las altas concentraciones de C1Inh características del fenotipo de AEH tipo II.

7.8. Cuantificación de la actividad del proteasoma 20S

La actividad tipo quimiotripsina del proteasoma se cuantificó en lisados de macrófagos ($0,5 \times 10^6$ células/lisado) procedentes de dos cultivos independientes de monocitos del paciente GZ y de tres controles sanos, tanto en condiciones basales como en presencia de IFN- γ para inducir la expresión del gen *C1NH*. En el paciente GZ, ambas extracciones se realizaron a los 28 meses de tratamiento con andrógenos atenuados.

Figura 25. Cuantificación de la actividad 20S proteasoma



Los símbolos (-) y (+) representan, respectivamente, la ausencia ó presencia de IFN γ en el medio de cultivo.

Los lisados de macrófagos del paciente GZ presentan una actividad del proteasoma tres veces superior a la de macrófagos control, tanto en condiciones basales, como en presencia de IFN- γ , sugiriendo una activación crónica de este sistema proteolítico (**Fig.25**).

Como se comentó en la introducción (**apartado 3.7**), se ha documentado la activación del proteasoma en hepatocitos de pacientes deficientes de A1AT, portadores de la mutación Glu342Lis (variante Z), que induce polimerización. Las mutaciones poliméricas de A1AT y las mutaciones descritas en las serpinas HC y Necrotica, que impiden la secreción de la proteína sin formar polímeros, sobrecargan el retículo endoplásmico y causan la activación de diversos sistemas proteolíticos.

No hemos detectado formas poliméricas en el plasma del paciente GZ (**Fig.19**) ni en los sobrenadantes de los cultivos de células Cos-7, mediante PAGE en gradiente de densidad (4-14%) y condiciones no reductoras (**dato no mostrado**). Sin embargo, es probable es que si la mutación Arg378Cys induce la formación de polímeros, estos queden retenidos en las vías secretoras, induciendo la activación del proteasoma como parte de una respuesta de estrés del retículo endoplásmico, como se ha comentado para el caso de la variante Z de A1AT (**Lomas, 2006**). Dado que no hemos realizado ningún estudio de la conformación intracelular de la proteína, no podemos descartar la presencia de polímeros en la vía secretora de los macrófagos del paciente.

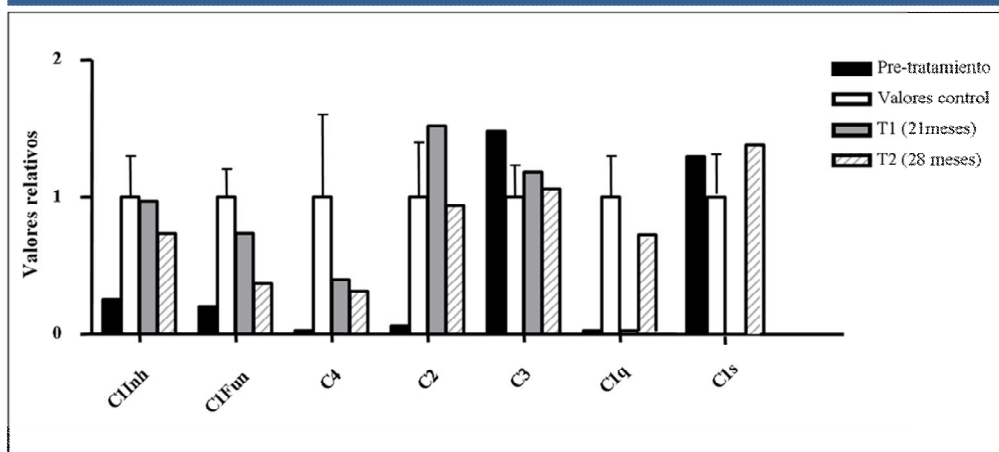
En cualquier caso, dada la analogía de la mutación Arg378Cys con la variante Z de A1AT (**apartado 7.4**), la activación crónica del proteasoma en el paciente GZ indica también un perfil similar de estrés de las vías de secreción. Estos resultados, además, sugieren por primera vez la implicación del sistema ubiquitina-proteasoma en la patología del AEH.

Por otra parte, existen diversos factores, no controlados en este experimento, que podrían contribuir a la activación crónica del proteasoma 20S en el paciente GZ. Entre ellos, sin duda el de mayor importancia es el tratamiento con andrógenos atenuados. Los andrógenos modulan simultáneamente la transcripción de cientos de genes (**Brinkmann et al, 1999**), entre los que se encuentran algunos genes de respuesta a estrés del retículo endoplásmico (**Segawa et al, 2002**). Además, existen evidencias de que el sistema ubiquitina-proteasoma participa, de manera aún no bien comprendida, en la regulación del ensamblaje del receptor soluble de andrógenos, en su traslocación al núcleo y en la interacción del receptor con otros reguladores de la transcripción (**Lin et al, 2002; Kang et al, 2002**). Al no haber dispuesto de monocitos del paciente antes de que éste iniciara el tratamiento con andrógenos atenuados, no hemos podido evaluar su posible contribución a la activación crónica del proteasoma.

7.9. Seguimiento clínico y bioquímico del paciente GZ.

A lo largo de los veintiocho meses de seguimiento desde el diagnóstico de AEH, se observa una clara mejoría clínica y de los niveles en sangre de los componentes iniciales de la vía clásica del complemento (**Fig.26**).

Figura 26. Perfil de complemento a lo largo del tratamiento con andrógenos atenuados



Los valores antigénicos o funcionales aparecen referidos a los valores control utilizados en cada caso.

El paciente GZ dejó de sufrir síntomas de angioedema antes del primer mes tras el inicio del tratamiento con el andrógeno atenuado estanozolol y ha permanecido asintomático desde entonces. En las muestras obtenidas durante el tratamiento (muestras T1 y T2, tras 21 y 28 meses de tratamiento), los niveles de C1Inh y C2 habían recuperado valores normales (C1Inh 16,5 mg/dL en T1 y 9 mg/dL en T2; C2 166% en T1 y 93% en T2 respecto a controles). Sin embargo, la funcionalidad de C1Inh en el plasma del paciente seguía siendo baja (36% respecto a controles en T1 y 17% en T2) y los niveles de C4, a pesar de haber aumentado sustancialmente (12 mg/dL en T1 y 9 mg/dL en T2), no alcanzaron los valores de referencia (**Fig.26**).

En base a nuestros resultados, no se puede establecer una relación clara entre el consumo de andrógenos y la concentración de C1q. A pesar de la clara mejoría clínica y de la estabilidad que muestran los niveles del resto de componentes iniciales a lo largo del tratamiento, C1q continuaba siendo indetectable en T1 pero se recuperó, de forma aparentemente espontánea, hasta los 110 mg/dL en T2 (**Fig.26**). La falta de correlación con la mejoría clínica y con el aumento de los niveles del resto de componentes iniciales, sugiere, en cualquier caso, que la ausencia de C1q en el paciente GZ no se debía exclusivamente a un fenómeno de consumo directo de esta proteína por la activación crónica de la vía clásica del complemento.

C1q es una proteína de reconocimiento de patrones moleculares que se une a sus múltiples ligandos por un mecanismo de interacción electrostática. Además de las proteínas C1s y C1r del complemento, C1q tiene otras múltiples dianas, tanto intracelulares como extracelulares. Entre ellas, la proteína C reactiva y la pentraxina 5

(**Roumanina et al, 2006**), polianiones como la heparina y el ADN (**Garlatti et al, 2010**), los oligómeros citotóxicos de priones (**Erlich et al, 2010**), los proteoglicanos de la matriz extracelular (**Groeneveld et al, 2005**) y algunos receptores de membrana, como CD91 (receptor de la α 2-macroglobulina) (**Duus et al, 2010**) o los receptores para las regiones tipo colágeno (cC1q, calreticulina) y globulares (gC1qR) de C1q (**Bossi et al, 2009**).

Dado su amplio repertorio de dianas y los diversos procesos fisiológicos en los que parece estar involucrado C1q, su ausencia en el paciente GZ puede deberse, además de a una activación evidente de la vía clásica del complemento, al consumo por alguno de sus otros ligandos.

7.10. Discusión general de la mutación Arg378Cys en homocigosis.

Como se ha comentado en el apartado 3.5, el análisis mutacional del gen *C1NH* en pacientes de AEH de distintas poblaciones ha permitido identificar hasta la fecha más de doscientas mutaciones en heterocigosis distintas (**Bowen et al, 2001, Blanch et al, 2002; Roche et al, 2005b; Pappalardo et al, 2008**). A pesar de esta gran diversidad de alteraciones, hasta fechas recientes la detección de mutaciones homocigotas se limitaba a dos únicos casos, la sustituciones c.-103C>T y c.-101A>G, que afectan a la región promotora del gen y se asocian a un patrón de herencia recesivo de la enfermedad. Este hecho, hizo suponer que las mutaciones en homocigosis en la región codificante de *C1NH* podrían resultar letales durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, el hallazgo de dos pacientes homocigotos para la mutación c.1576T>G (Ile440Ser) permitió descartar esta hipótesis y parecía sugerir que, o bien la baja incidencia de la enfermedad dificultaba la detección de pacientes homocigotos, o que únicamente aquellos pacientes con mutaciones homocigotas asociadas a fenotipos leves resultaban viables (**Blanch et al, 2006**).

Un dato que parece apoyar la hipótesis de las mutaciones homocigotas asociadas a fenotipos leves y con herencia recesiva es la ausencia de manifestaciones clínicas en los familiares heterocigotos de los dos hermanos homocigotos Ile440Ser, descritos por Blanch *et al* (2006). De forma similar, los resultados del estudio de la mutación Arg378Cys en la familia GZ sugieren también un patrón de herencia recesivo para esta mutación.

Existen importantes similitudes entre las dos familias con mutaciones en homocigosis en la región codificante de *C1NH*. En ambos casos, la ausencia de clínica en los heterocigotos contrasta con su perfil de complemento de AEH tipo II (con baja función de C1Inh y niveles de C4 bajos o en el límite de normalidad). Además, tanto los homocigotos Ile440Ser como los del cambio Arg378Cys, muestran fenotipos de AEH tipo I (bajas concentraciones de C1Inh y C4), consumo de los componentes iniciales de la vía clásica del complemento y un C1q indetectable.

A pesar de dar lugar a perfiles de complemento y fenotipos de AEH casi idénticos, existen también diferencias funcionales destacables entre ambas mutaciones. El cambio de aminoácido Ile440Ser produce una pérdida de función severa en C1Inh, bloqueando casi por completo su interacción con C1s y kalikreína. En el caso de la mutación Arg378Cys, la pérdida de función es menos severa y en cierto modo selectiva, ya que afecta de forma importante a la interacción con la kalikreína (<40% respecto a controles), pero forma complejos con C1s de forma normal (~80% respecto a controles). La existencia de un perfil de activación de complemento idéntico en ambos pacientes homocigotos parece apoyar la activación recíproca de los sistemas del complemento y la generación de kininas (**apartado 2.2**). En efecto, es posible que, cuando exista una activación prolongada del sistema de contacto (por infecciones, descenso de la síntesis de C1Inh, etc.), la kalikreína y los fragmentos del FXII liberados contribuyan significativamente a activar la vía clásica del complemento en estos pacientes (**Kirchfink y Borsos, 1988**).

Otra diferencia importante entre los pacientes homocigotos para las mutaciones Ile440Ser y Arg378Cys radica en el consumo del componente C1. Mientras que en los homocigotos Ile440Ser, la ausencia de C1q va acompañada de consumo de C1s y activación de C1r, en el paciente GZ los niveles de C1s son normales, tanto antes del tratamiento, como a los 28 meses del inicio de la toma de andrógenos atenuados (**Fig.26**). Este hecho podría estar relacionado con el mecanismo fisiopatológico de C1Inh Arg378Cys. La capacidad inhibidora del C1Inh Arg378Cys sobre C1s, podría ser suficiente para controlar su activación mediada por anticuerpos y conservar así sus niveles dentro de un rango normal. En tal caso, el consumo observado de los componentes C4 y C2 sería resultado, como ya se ha comentado, de activación recíproca entre los sistemas de complemento y de activación por contacto.

Sin embargo, esta hipótesis no permite explicar el consumo observado de C1q, ni la recuperación de sus niveles tras 28 meses de tratamiento en el paciente GZ. Como se comentó en el apartado anterior, C1q tiene una gran variedad de dianas además de las proteínas C1r y C1s del complemento, cuya implicación en la patología del AEH no se conoce. Por ello, no podemos descartar que otros mecanismos moleculares, que no han sido investigados en este trabajo, participen en la regulación de los niveles de este componente.

Por otra parte, el cambio Arg378Cys ha sido descrito previamente en pacientes heterocigotos que desarrollan clínica de AEH (**Göbwein et al, 2008**). Esto contradice la herencia recesiva observada por nosotros y parece indicar, más bien, una penetrancia incompleta de la mutación Arg378Cys en la familia GZ. Esta penetrancia variable de la mutación en distintas familias, sugiere a su vez la existencia de otros genes involucrados en el desarrollo de la sintomatología del AEH. Curiosamente, en algunos heterocigotos para la mutación Arg378Cys, el grupo de Cicardi y colaboradores ha reportado una clínica variable de angioedema asociada a desencadenantes diversos, como determinados alimentos (**Sonia Caccia, comunicación personal**), lo que apoya la existencia de tales genes modificadores de la enfermedad.

Diversos estudios genéticos de pacientes con AEH, han identificado algunos *loci* que modifican el metabolismo de las quininas y podrían influir en la sintomatología del angioedema. La enzima Aminopeptidasa P (APP), una metaloproteasa que degrada las formas activas de la bradikinina (BK) (especialmente la des-Arg(9)-BK), ha sido estudiada en los últimos años. Una actividad baja de esta enzima se asocia con niveles altos de BK y con angioedema en pacientes hipertensos que reciben tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (**Adam et al, 2002**). Además, al igual que ocurre con C1Inh, los niveles de APP se incrementan en respuesta al tratamiento con andrógenos. Por todo ello, APP es un gen candidato a participar en la clínica del AEH, aunque harán falta estudios epidemiológicos más amplios para conocer su grado implicación real en esta patología. Otras enzimas candidatas, por su importancia en el catabolismo de la BK, son la carboxipeptidasa N (CPN) y ACE (**Drouet et al, 2008**).

Por otro lado, los resultados del estudio funcional de la mutación Arg378Cys revelan que este residuo debe tener un papel importante en el control de la kalikreína. La especificidad de las serpinas reside (o al menos gran parte de ella) en el residuo P1. Así, por ejemplo, la mutación Met→Val en el residuo P1 de A1AT, convierte a esta serpina (cuya diana normal es la elastasa) en inhibidor de la trombina. Se han descrito mutaciones similares en el residuo P1 con efectos drásticos en la especificidad en otras serpinas como C1Inh o ATIII (**Eldering et al, 1992**).

Sin embargo, se sabe también que en muchas serpinas (si no en todas) existen, además, sitios secundarios de interacción. Dado que los distintos miembros de la familia serpina exhiben especificidades muy variadas, a pesar de la poca diversidad de residuos que presentan en su centro activo, se cree que los sitios secundarios de interacción determinan o refinan su especificidad. Así, en el caso de la interacción C1Inh-C1s, los residuos del extremo C-terminal del RCL Q452, Q453 y F455 son esenciales para la formación de complejos estables serpina-proteasa (**He et al, 1997**). En otras serpinas, como ZPI (que inhibe al factor FXa de la coagulación), y AT (que inhibe a FIXa y FXa), se han descrito otros residuos similares en la región C-terminal del RCL (**Gettins y Olson, 2009**).

El residuo Arg378 de C1Inh parece funcionar también como un sitio de interacción secundaria con proteasas (en este caso con la kalikreína). A favor de esta hipótesis, Bos y colaboradores demostraron que la Arg378 es un sitio de unión a heparina. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la acción inhibidora de algunas serpinas, como C1Inh y AT, se potencia por la presencia de glucosaminoglicanos (GAGs) como el sulfato de dextrano y la heparina (**Bos et al, 2001**). Este efecto se debe a que las cargas negativas de estos polianiones estabilizan, mediante un mecanismo denominado “sándwich”, las superficies de contacto entre serpina y proteasa, que presentan distribuciones de carga mayoritariamente positivas (**Beinrohr et al, 2007**). Los sitios de interacción secundaria serpina-proteasa también se ven afectados por los GAGs. En la serpina AT, por ejemplo, tales sitios de interacción son inactivos en condiciones normales porque interaccionan desfavorablemente con la superficies cercanas al centro activo. Esto tiene como consecuencia la aparición de fuerzas repulsivas entre el RCL de la serpina y las proteasas que se aproximen a él. En presencia de GAGs, sin embargo, tienen lugar cambios conformacionales en la molécula que exponen y “activan” los sitios de interacción secundaria en la región C-terminal, facilitando la actividad de la serpina (**Gettins y Olson, 2009**).

El mecanismo por el cual el residuo Arg378 ejerce su función como sitio de interacción secundaria parece ser diferente al del resto de sitios de este tipo descritos hasta ahora. Por un lado, está situado en la región *gate*, muy alejada del extremo C-terminal del RCL. Además, la mutación de este aminoácido tiene consecuencias estructurales drásticas en la conformación de la proteína, como indican la presencia exclusiva de la forma cortada/latente de 96 kDa en el plasma del paciente GZ y los estudios conformacionales con los anticuerpos monoclonales KII y KOK12.

8. ESTUDIO DE PACIENTES CON AEH TIPO III EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA.

Hemos llevado a cabo un cribado de mutaciones en el exón 9 del FXII en 75 personas de la población española. Todas ellas habían manifestado en algún momento síntomas de angioedema, a pesar de presentar unos niveles de C1Inh (tanto antigénicos como funcionales) y un perfil de complemento (niveles de C3 y C4) dentro de la normalidad. En algunos pacientes, además, se descartó mediante secuenciación del gen *C1NH*, la presencia de mutaciones causantes de AEH de tipos I y II.

Tabla 6. Estudios familiares del HAE tipo III en la población española

Código de familia	Miembros estudiados	Thr309Lys ⁺	Hombres Thr309Lys ⁺	Mujeres Thr309Lys ⁺
AEE-A	20	11	3	8
AEE-B	5	5	-	5
AEE-D	4	2	1	1
AEE-G	4	0	-	-
AEE-AJ	3	3	1	2
AEE-M	3	0	-	-
AEE-N	3	3	-	3
AEE-AF	2	2	-	2
AEE-O	2	2	-	2
AEE-U	2	2	1	1
AEE-Z	2	2	0	2
Total	50	32	6	26

La denominación AEE de las familias de la serie hace referencia a “angioedema asociado a estrógenos”

En vista de los resultados, nuestra población de estudio puede dividirse en casos con historia familiar (50 individuos) y casos esporádicos (25 individuos).

Los 50 casos con historia familiar pertenecían a 11 familias no relacionadas en las que más de un miembro presentaba síntomas de angioedema compatibles con AEH tipo III. En 9 de estas familias hemos podido confirmar la presencia de la mutación c.1032C>A (Thr309Lys) en heterocigosis en alguno de sus miembros, para un total de 32 individuos (26 mujeres y 6 hombres) portadores (**Tabla 6**). Ninguno de los pacientes estudiados presentaba la otra mutación del FXII descrita en esta variante de AEH

(c.1032C>G, Thr309Arg), que, por otra parte, parece ser también mucho menos frecuente en las series de pacientes estudiadas por otros autores (**Bork et al, 2010**).

De los 25 casos esporádicos que hemos estudiado, ninguno presentaba defectos en el exón 9 del gen FXII. Esta ausencia de mutaciones aisladas parece indicar una muy baja frecuencia de alteraciones *de novo* en el AEH tipo III y apoya la hipótesis postulada por Cichon y cols., de un origen ancestral del alelo Thr309Lys en la población europea (**Cichon et al, 2006**).

Todas las mujeres portadoras han manifestado síntomas de angioedema a partir de la pubertad hasta la menopausia y, como se ha descrito en la bibliografía, en muchos casos existe una correlación entre los episodios de angioedema y las fases del ciclo menstrual. Entre los factores desencadenantes, los más habituales son el embarazo, el consumo de anticonceptivos orales que contengan estrógenos en su composición y las terapias de sustitución hormonal.

De los seis hombres portadores de la mutación en nuestra serie, cinco de ellos no han manifestado ningún síntoma de angioedema. El sexto paciente portador (U2), un hombre inicialmente diagnosticado de angioedema idiopático, tiene episodios de angioedema localizados en la cara con una frecuencia aproximada de un ataque al año y sin respuesta al tratamiento con Icatibant (antagonista del receptor B2 de la bradikina), Berinert (C1Inh purificado de plasma para perfusión) y esteroides. Este paciente no ha recibido ningún tratamiento hormonal que pudiera justificar un fenotipo de AEH asociado a estrógenos y no presenta mutaciones en *C1NH* causantes de AEH de tipos I o II. Además, dentro de la familia del paciente (familia U), la mutación Thr309Lys cosegrega con la enfermedad.

Como se ha comentado en la introducción, el AEH tipo III afecta casi exclusivamente a mujeres en edad fértil. Sin embargo, se han descrito algunas familias en las que la segregación de la mutación Thr309Lys da lugar a manifestaciones clínicas tanto en mujeres como en hombres (**Martin et al, 2007; Bork et al, 2005**) y en las que se ha observado la transmisión de la enfermedad entre hombres de distintas generaciones. En todos los casos, sin embargo, los hombres afectados AEH tipo III tienen una sintomatología menos severa, con menor frecuencia de ataques y con una edad de inicio generalmente muy tardía (en la sexta década de vida), datos que concuerdan con las características del paciente U2 descrito en nuestra serie.

La identificación de hombres portadores de la mutación Thr309Lys y afectos de AEH en estas familias, inicialmente diagnosticadas de AEH tipo III, así como de casos de penetrancia incompleta de esta mutación (**Gupta et al, 2004**), ha hecho que empiece a reconsiderarse la clasificación de las variantes de AEH asociadas a estrógenos. Estos datos indican que existe una base genética de la enfermedad más compleja de lo que inicialmente se había supuesto y sugieren que en estas familias deben segregarse otros genes que modifiquen la patogénesis del AEH.

En conjunto, los resultados de nuestro estudio del AEH tipo III en la población española ponen de manifiesto la importancia de la historia familiar para el diagnóstico de la enfermedad (dada la ausencia de casos esporádicos para la mutación Thr309Lys del FXII) y apoyan la hipótesis del origen común de esta mutación en un ancestro europeo.

Además, la presencia de hombres heterocigotos para este alelo que desarrollan síntomas en esta y otras series de pacientes, hace necesaria la búsqueda de factores genéticos adicionales que expliquen la aparente variabilidad clínica en el angioedema asociado a estrógenos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha reunido una serie de 127 pacientes pertenecientes a 63 familias con AEH por deficiencia de C1Inh, de las cuales 50 (86%) tenían fenotipos compatibles con AEH tipo I, 7 (13%) con AEH tipo II y una única familia presentaba un fenotipo intermedio.
2. Hemos identificado 51 mutaciones distintas en los pacientes con AEH de tipos I y II. Un 49% del total produce cambios de aminoácido, un 23% introduce cambios en el marco de lectura o codones Stop prematuros, un 14% altera el proceso de *splicing* del ARN, un 8% son grandes deleciones que afectan a uno o varios exones del gen y solo un 6% son inserciones o deleciones que no modifican el marco de lectura. En 5 pacientes, todos ellos con AEH tipo I, no se identificó ninguna alteración en el gen *C1NH*.
3. Gran parte de las mutaciones identificadas en *C1NH* (27; 53%) no habían sido descritas previamente y se ha podido confirmar que las mutaciones encontradas en 10 pacientes de nuestra serie (18%), en los que no existe historia familiar de AEH, son alteraciones *de novo*.
4. El perfil bioquímico de proteínas del sistema de complemento en el paciente GZ, portador de la mutación Arg378Cys en *C1NH* en homocigosis, muestra, al igual que en los pacientes homocigotos para la mutación Ile440Ser previamente descritos, un consumo generalizado de los componentes iniciales de la vía clásica C4, C2 y C1q. En ambas familias, los miembros homocigotos desarrollan AEH tipo I, mientras que los heterocigotos desarrollan AEH tipo II y no manifiestan síntomas, lo que sugiere un patrón de herencia autosómico recesivo de la enfermedad.
5. La mutación Arg378Cys altera la especificidad de C1Inh, permitiendo su interacción con la proteasa C1s, pero dificultando de forma significativa la formación de complejos estables con la proteasa kalikreína, tanto en el plasma como en los sobrenadantes de cultivos de células Cos7. Estos resultados ponen

de manifiesto la importancia de la arginina 378 para el control de la producción de kininas, principales mediadoras de la clínica en el AEH.

6. Los niveles de transcripción de *C1NH* están drásticamente disminuidos en los pacientes homocigotos para las mutaciones Arg378Cys e Ile440Ser.
7. La mutación Arg378Cys de *C1Inh* es análoga a la variante Z de A1AT y modifica, de forma similar a ésta, el plegamiento del dominio serpina. El cambio Arg378Cys en la región *gate*, impide posiblemente la conexión entre las hebras s6A y s5A de la lámina β A e induce una conformación similar a la de las formas latentes, que se asocia con una activación constitutiva del proteasoma 20S.
8. Un alto porcentaje de los casos de angioedema compatible con el fenotipo asociado a estrógenos en nuestra serie de pacientes se debe a la mutación Thr309Lys en el FXII de la coagulación. Todos los pacientes portadores de esta mutación en nuestra serie pertenecen a familias en las que existen otros miembros afectados y en ningún caso se han detectado mutaciones *de novo*. Estos resultados subrayan la importancia de la historia familiar para el diagnóstico del AEH tipo III y apoyan la hipótesis del origen común de esta mutación en un ancestro europeo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage Y, Agostoni A. Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet*. 2002;359(9323):2088-9.

Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-Inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1992;(4):206-15.

Agostoni A, Cicardi M. Drug-induced angioedema without urticaria. *Drug Saf*. 2001;24(8):599-606. Review.

Agostoni A, Aygören-Pürsün E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, Bucher C, Castaldo AJ, Cicardi M, Davis AE, De Carolis C, Drouet C, Duponchel C, Farkas H, Fáy K, Fekete B, Fischer B, Fontana L, Füst G, Giacomelli R, Gröner A, Hack CE, Harmat G, Jakenfelds J, Juers M, Kalmár L, Kaposi PN, Karádi I, Kitzinger A, Kollár T, Kreuz W, Lakatos P, Longhurst HJ, Lopez-Trascasa M, Martinez-Saguer I, Monnier N, Nagy I, Németh E, Nielsen EW, Nuijens JH, O'grady C, Pappalardo E, Penna V, Perricone C, Perricone R, Rauch U, Roche O, Rusicke E, Späth PJ, Szendei G, Takács E, Tordai A, Truedsson L, Varga L, Visy B, Williams K, Zanichelli A, Zingale L. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(3 Suppl):S51-131.

Akita N, Nakase H, Kaido T, Kanemoto Y, Sakaki T. Protective effect of C1 esterase inhibitor on reperfusion injury in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Neurosurgery*. 2003;52(2):395-400.

Beinrohr L, Harmat V, Dobó J, Lörincz Z, Gál P, Závodszky P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem*. 2007;282(29):21100-9

Berrettini M, Lämmle B, White T, Heeb MJ, Schwarz HP, Zuraw B, Curd J, Griffin JH. Detection of in vitro and in vivo cleavage of high molecular weight kininogen in human plasma by immunoblotting with monoclonal antibodies. *Blood*. 1986;68(2):455-62.

Binkley KE, Davis A 3rd. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(3):546-50.

Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:291-336.

Blanch A, Roche O, López-Granados E, Fontán G, López-Trascasa M. Detection of C1 inhibitor (SERPING1/C1NH) mutations in exon 8 in patients with hereditary angioedema: evidence for 10 novel mutations. *Hum Mutat*. 2002;20(5):405-6.

Blanch A, Roche O, Urrutia I, Gamboa P, Fontán G, López-Trascasa M. First case of homozygous C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(6):1330-5. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(3):745.

Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H. Hereditary angioedema with normal C1-Inhibitor activity in women. *Lancet*. 2000;356(9225):213-7.

- Bork K, Schneiders V. Danazol-induced hepatocellular adenoma in patients with hereditary angio-oedema. *J Hepatol.* 2002;36(5):707-9.
- Bork K, Gül D, Dewald G. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor in a family with affected women and men. *Br J Dermatol* 2005;154:542-5.
- Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J: Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs and course. *Am J Med* 2006 , 119:26-274.
- Bork K, Frank J, Grundt B, Schlattmann P, Nussberger J, Kreuz W. Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant). *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(6):1497-503.
- Bork K. Diagnosis and treatment of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology.* 2010; 6:15.
- Bos IG, van Mierlo GJ, Bleeker WK, Rigter GM, te Velthuis H, Dickneite G, Hack CE. The potentiation of human C1-inhibitor by dextran sulphate is transient in vivo: studies in a rat model. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(8):1583-95.
- Bossi F, Fischetti F, Regoli D, Durigutto P, Frossi B, Gobeil F Jr, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, Cicardi M, Tedesco F. Novel pathogenic mechanism and therapeutic approaches to angioedema associated with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(6):1303-10.
- Bowen B, Hawk JJ, Sibunka S, Hovick S, Weiler JM. A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. *Clin Immunol.* 2001;98(2):157-63.
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;69(1-6):307-13. Review.
- Büyüköztürk S, Eroğlu BK, Gelincik A, Uzümcü A, Özşeker F, Colakoğlu B, Dal M, Uyguner ZO. A Turkish family with a novel mutation in the promoter region of the C1 inhibitor gene. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(4):962-4.
- Cai S, Davis AE 3rd. Complement regulatory protein C1 inhibitor binds to selectins and interferes with endothelial-leukocyte adhesion. *J Immunol.* 2003;171(9):4786-91.
- Cai S, Dole VS, Bergmeier W, Scafidi J, Feng H, Wagner DD, Davis AE 3rd. A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J Immunol.* 2005;174(10):6462-6.
- Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med.* 2002;346(1):45-53. Review.
- Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(10):981-6. Review.
- Carter PE, Duponchel C, Tosi M, Fothergill JE. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Eur J Biochem.* 1991;197(2):301-8.

- Cicardi M, Bergamaschini L, Cugno M, Beretta A, Zingale LC, Colombo M, Agostoni A. Pathogenetic and clinical aspects of C1 inhibitor deficiency. *Immunobiology*. 1998;199(2):366-76. Review.
- Cicardi M, Zingale L. How do we treat patients with hereditary angioedema. *Transfus Apher Sci*. 2003;29(3):221-7.
- Cicardi M, Zanichelli A. Acquired angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010;6(1):14.
- Cichon S, Martin L, Hennies HC, Müller F, Van Driessche K, Karpushova A, Stevens W, Colombo R, Renné T, Drouet C, Bork K, Nöthen MM. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet*. 2006;79(6):1098-104.
- Confavreux C, Sève P, Broussolle C, Renaudier P, Ducerf C. Danazol-induced hepatocellular carcinoma. *QJM*. 2003;96(4):317-8.
- Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet*. 1990;85(1):55-74. Review.
- Corral J, Aznar J, Gonzalez-Conejero R, Villa P, Miñano A, Vayá A, Carrell RW, Huntington JA, Vicente V. Homozygous deficiency of heparin cofactor II: relevance of P17 glutamate residue in serpins, relationship with conformational diseases, and role in thrombosis. *Circulation*. 2004;110(10):1303-7.
- Cugno M, Nussberger J, Cicardi M, Agostoni A. Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(3):311-7.
- Davis AE 3rd, Aulak K, Parad RB, Stecklein HP, Eldering E, Hack CE, Kramer J, Strunk RC, Bissler J, Rosen FS. C1 inhibitor hinge region mutations produce dysfunction by different mechanisms. *Nat Genet*. 1992;1(5):354-8.
- Davis AE 3rd. The pathophysiology of hereditary angioedema. *Clin Immunol*. 2005;114(1):3-9. Review.
- Davis AE 3rd. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, III: mechanisms of hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;100(1 Suppl 2):S7-12. Review.
- Davis AE 3rd, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost*. 2010;104(5).
- Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab*. 1999;67(3):183-93. Review.
- Dendorfer A, Wolfrum S, Dominiak P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn J Pharmacol*. 1999;79(4):403-26. Review.
- De Serres J, Gröner A, Lindner J. Safety and efficacy of pasteurized C1 inhibitor concentrate (Berinert P) in hereditary angioedema: a review. *Transfus Apher Sci*. 2003;29(3):247-54.

De Simoni MG, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Echart C, Bergamaschini L. The powerful neuroprotective action of C1-inhibitor on brain ischemia-reperfusion injury does not require C1q. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1857-63.

Dewald G, K.. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343(4):1286-9.

Donaldson VH, Evans RR. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C'1 esterase. *Am J Med.* 1963;35:37-44.

Drouet C, Désormeaux A, Robillard J, Ponard D, Bouillet L, Martin L, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Bosson JL, Quesada JL, López-Trascasa M, Adam A. Metallopeptidase activities in hereditary angioedema: effect of androgen prophylaxis on plasma aminopeptidase P. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(2):429-33.

Duus K, Hansen EW, Tacnet P, Frachet P, Arlaud GJ, Thielens NM, Houen G. Direct interaction between CD91 and C1q. *FEBS J.* 2010;277(17):3526-37.

Eldering E, Huijbregts CC, Lubbers YT, Longstaff C, Hack CE. Characterization of recombinant C1 inhibitor P1 variants. *J Biol Chem.* 1992;267(10):7013-20.

Eldering E, Verpy E, Roem D, Meo T, Tosi M. COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J Biol Chem.* 1995;270(6):2579-87.

Erlich P, Dumestre-Pérard C, Ling WL, Lemaire-Vieille C, Schoehn G, Arlaud GJ, Thielens NM, Gagnon J, Cesbron JY. Complement protein C1q forms a complex with cytotoxic prion protein oligomers. *J Biol Chem.* 2010;285(25):19267-76.

Farkas H, Szongoth M, Bély M, Varga L, Fekete B, Karádi I, Füst G. Angioedema due to acquired deficiency of C1-esterase inhibitor associated with leucocytoclastic vasculitis. *Acta Derm Venereol.* 2001;81(4):298-300.

Farkas H, Varga L, Széplaki G, Visy B, Harmat G, Bowen T. Management of hereditary angioedema in pediatric patients. *Pediatrics.* 2007;120(3):713-22.

Frank MM. Complement disorders and hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S262-71. Review.

Frigas E, Nzeako UC. Angioedema. Pathogenesis, differential diagnosis, and treatment. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2002;23(2):217-31.

Garlatti V, Chouquet A, Lunardi T, Vivès R, Païdassi H, Lortat-Jacob H, Thielens NM, Arlaud GJ, Gaboriaud C. Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):808-12.

Gettins PG, Olson ST. Activation of antithrombin as a factor IXa and Xa inhibitor involves mitigation of repression rather than positive enhancement. *FEBS Lett.* 2009;583(21):3397-400.

Ghebrehiwet B, Silverberg M, Kaplan AP. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med.* 1981;153(3):665-76.

Ghebrehiwet B, Randazzo BP, Dunn JT, Silverberg M, Kaplan AP. Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Clin Invest.* 1983;71(5):1450-6.

Gompels MM, Lock RJ, Abinun M, Bethune CA, Davies G, Grattan C, Fay AC, Longhurst HJ, Morrison L, Price A, Price M, Watters D. C1 inhibitor deficiency: consensus document. *Clin Exp Immunol* 2005;139(3):379-94.

Gooptu B, Lomas DA. Polymers and inflammation: disease mechanisms of the serpinopathies. *J Exp Med.* 2008;205(7):1529-34. Review.

Groeneveld TW, Oroszlán M, Owens RT, Faber-Krol MC, Bakker AC, Arlaud GJ, McQuillan DJ, Kishore U, Daha MR, Roos A. Interactions of the extracellular matrix proteoglycans decorin and biglycan with C1q and collectins. *J Immunol.* 2005;175(7):4715-23.

Göbwein T, Kocot A, Emmert G, Kreuz W, Martinez-Saguer I, Aygören-Pürsün E, Rusicke E, Bork K, Oldenburg J, Müller CR. Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenet Genome Res* 2008;121:181-188.

Green C, Brown G, Dafforn TR, Reichhart JM, Morley T, Lomas DA, Gubb D. *Drosophila* necrotic mutations mirror disease-associated variants of human serpins. *Development.* 2003;130(7):1473-8.

Grigoriadou S, Longhurst HJ. Clinical immunology review series: an approach to the patient with angio-oedema. *Clin Exp Immunol* 2009;155:367-77.

Groeneveld TWL, Oroszlán M, Owens T, Faber-Krol MC, Bakker AC, Arlaud GJ, McQuillan DJ, Kishore U, Daha MR, Ross A. Interactions of the extracellular matrix proteoglycans Decorin and Biglycan with C1q and Collectins. *J.Immunol.*, 2005;175:4715-23.

Gupta S, Yu F, Klaustermeyer WB. New variant hereditary angioedema in three brothers with normal C1 esterase inhibitor level and function, *Allergy.* 2004;59:557–558.

Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE 3rd. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest.* 2002;109(8):1057-63.

He S, Yang JC, Tsang S, Sim RB, Whaley K. Role of the distal hinge region of C1-inhibitor in the regulation of C1s activity. *FEBS Lett.* 1997;412(3):506-10.

Hecker JM, Loss M, Klempnauer J, Winkler M. C1-inhibitor for therapy and prophylaxis of acute vascular rejection of porcine kidneys in cynomolgus monkeys. *Transplant Proc.* 2002;34(6):2382.

Hiemstra PS, Daha MR, Bouma BN. Activation of factor B of the complement system by kallikrein and its light chain. *Thromb Res.* 1985;38(5):491-503.

- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* 2000;10(12):1845-64.
- Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, Torene S, Pittard WS, Neuwald AF, Van Meir EG, Vertino PM, Devine SE. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell.* 2010;141(7):1253-61.
- Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med.* 1992;117(3):234-42.
- Jiang H, Wagner E, Zhang H, Frank MM. Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J Exp Med.* 2001;194(11):1609-16.
- Kang Z, Pirskanen A, Jänne OA, Palvimo JJ. Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48366-71.
- Kalmár L, Bors A, Farkas H, Vas S, Fandl B, Varga L, Füst G, Tordai A. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Hum Mutat.* 2003;22(6):498.
- Kalmár L, Hegedüs T, Farkas H, Nagy M, Tordai A. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum Mutat.* 2005;25(1):1-5.
- Kaplan AP, Ghebrehwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol.* 2010;47(13):2161-9. Review.
- Kawachi Y, Hibi T, Yamazaki S, Otsuka F. A novel donor splice site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type I hereditary angioneurotic edema. *J Invest Dermatol.* 1998;110(5):837-9.
- Kirschfink M, Borsos T. Binding and activation of C4 and C3 on the red cell surface by non-complement enzymes. *Mol Immunol.* 1988;25(5):505-12.
- Kramer J, Katz Y, Rosen FS, Davis AE 3rd, Strunk RC. Synthesis of C1 inhibitor in fibroblasts from patients with type I and type II hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest.* 1991;87(5):1614-20.
- Kramer J, Rosen FS, Colten HR, Rajczyk K, Strunk RC. Transinhibition of C1 inhibitor synthesis in type I hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest.* 1993;91(3):1258-62.
- Kroutil LC, Register K, Bebenek K, Kunkel TA. Exonucleolytic proofreading during replication of repetitive DNA. *Biochemistry.* 1996; 35:1046-1053.
- Laird PW, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet.* 1994;3 Spec No:1487-95
- Lämmle B, Zuraw BL, Heeb MJ, Schwarz HP, Berrettini M, Curd JG, Griffin JH. Detection and quantitation of cleaved and uncleaved high molecular weight kininogen in plasma by ligand blotting with radiolabeled plasma prekallikrein or factor XI. *Thromb Haemost.* 1988;59(2):151-61.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L,

Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Erratum in: *Nature* 2001;412(6846):565.

Lappin D, Hamilton AD, Morrison L, Aref M, Whaley K. Synthesis of complement components (C3, C2, B and C1-inhibitor) and lysozyme by human monocytes and macrophages. *J Clin Lab Immunol*. 1986;20(3):101-5.

Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol*. 2006;7(5):216. Review.

Levi M, Choi G, Picavet C, Hack CE. Self-administration of C1-inhibitor concentrate in patients with hereditary or acquired angioedema caused by C1-inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(4):904-8.

Lin HK, Altuwaijri S, Lin WJ, Kan PY, Collins LL, Chang C. Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277(39):36570-6. Epub 2002 Jul 15.

- Liu D, Zhang D, Scafidi J, Wu X, Cramer CC, Davis AE 3rd. C1 inhibitor prevents Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability. *Blood*. 2005;105(6):2350-5.
- Lomas DA, Carrell RW. Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet*. 2002;3(10):759-68. Review.
- Lomas DA, Belorgey D, Mallya M, Miranda E, Kinghorn KJ, Sharp LK, Phillips RL, Page R, Robertson AS, Crowther DC. Molecular mousetraps and the serpinopathies. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 2):321-30.
- Lomas DA. The selective advantage of alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(10):1072-7.
- Malek R, Aulak KS, Davis AE 3rd. The catabolism of intact, reactive centre-cleaved and proteinase-complexed C1 inhibitor in the guinea pig. *Clin Exp Immunol*. 1996;105(1):191-7.
- Margolius HS. Tissue kallikreins structure, regulation, and participation in mammalian physiology and disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1998;16(4):337-49. Review.
- Martin L, Raison-Peyron N, Nothen MM, Cichon S, Drouet C, Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor gene in a family with affected women and men is associated with the p.Thr328Lys mutation in the F12 gene, *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):975-977.
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):386-98.
- Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renné T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 2009;139(6):1143-56.
- Ngan BY, Gelfand EW, Minta JO. A simple one-step haemolytic assay for C2 with C2-deficient human serum. *J Immunol*. 1977;118(3):736-741.
- Nuijens JH, Huijbregts CC, van Mierlo GM, Hack CE. Inactivation of C-1 inhibitor by proteases: demonstration by a monoclonal antibody of a neodeterminant on inactivated, non-complexed C-1 inhibitor. *Immunology*. 1987;61(3):387-9.
- Nuijens, J. H., Huijbregts, C. C., Eerenberg-Belmer, A. J., Abbink, J. J., Strack, v. S. R., Felt-Bersma, R. J., Thijs, L. G., and Hack, C. E. *Blood*. 1988;72:1841-1848.
- Nzeako UC, Frigas E, Tremaine WJ. Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. *Arch Intern Med*. 2001;161(20):2417-29.
- Nussberger J, Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(6):1321-2.
- Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S182-94.
- Pappalardo E, Cicardi M, Duponchel C, Carugati A, Choquet S, Agostoni A, Tosi M. Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1inhibitor gene of patients with angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(6):1147-54.

- Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. Increased expression of C1-inhibitor mRNA in patients with hereditary angioedema treated with Danazol. *Immunol Lett.* 2003;86(3):271-6.
- Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. C1 inhibitor gene expression in patients with hereditary angioedema: quantitative evaluation by means of real-time RT-PCR. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(3):638-44.
- Pappalardo E, Caccia S, Suffritti C, Tordai A, Zingale LC, Cicardi M. Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: functional and structural correlates. *Mol Immunol.* 2008;45(13):3536-44.
- Patston PA, Hauert J, Michaud M, Schapira M. Formation and properties of C1-inhibitor polymers. *FEBS Lett.* 1995;368(3):401-4.
- Pemberton PA, Harrison RA, Lachmann PJ, Carrell RW. The structural basis for neutrophil inactivation of C1 inhibitor. *Biochem J.* 1989;258(1):193-8.
- Perlmutter DH, Joslin G, Nelson P, Schasteen C, Adams SP, Fallon RJ. Endocytosis and degradation of alpha 1-antitrypsin-protease complexes is mediated by the serpin-enzyme complex (SEC) receptor. *J Biol Chem.* 1990;265(28):16713-6.
- Perlmutter DH, Schlesinger MJ, Pierce JA, Campbell EJ, Rothbaum RJ, Schwartz AL. Induction of the stress response in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Trans Assoc Am Physicians.* 1988;101:33-41.
- Pickering RJ, Good RA, Kelly JR, Gewurz H. Replacement therapy in hereditary angioedema. Successful treatment of two patients with fresh frozen plasma. *Lancet.* 1969;1(7590):326-30.
- Prada AE, Zahedi K, Davis AE 3rd. Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology.* 1998 Aug;199(2):377-88. Review.
- Prematta M, Gibbs JG, Pratt EL, Stoughton TR, Craig TJ. Fresh frozen plasma for the treatment of hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007;98(4):383-8. Review.
- Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR. Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(21):6321-33.
- Roche O, Blanch A, Caballero T, Sastre N, Callejo D, López-Trascasa M. Hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency: patient registry and approach to the prevalence in Spain. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2005a;94(4):498-503.
- Roche O, Blanch A, Duponchel C, Fontán G, Tosi M, López-Trascasa M. Hereditary angioedema: the mutation spectrum of SERPING1/C1NH in a large Spanish cohort. *Hum.Mutat.* 2005b;26(2):135-144.
- Rosen FS, Pensky J, Donaldson V, Charache P. Hereditary angioneurotic edema: Two genetic variants. *Science.* 1965;148:957-8.
- Roumenina LT, Ruseva MM, Zlatarova A, Ghai R, Kolev M, Olova N, Gadjeva M, Agrawal A, Bottazzi B, Mantovani A, Reid KB, Kishore U, Kojouharova MS. Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies

using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. *Biochemistry*. 2006;45(13):4093-104.

Segawa T, Nau ME, Xu LL, Chilukuri RN, Makarem M, Zhang W, Petrovics G, Sesterhenn IA, McLeod DG, Moul JW, Vahey M, Srivastava S. Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2002;21(57):8749-58.

Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL. Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol*. 1990;183:252-78. No abstract available.

Simonovic I, Patston PA. The native metastable fold of C1-inhibitor is stabilized by disulfide bonds. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1481(1):97-102.

Skriver K, Radziejewska E, Silbermann JA, Donaldson VH, Bock SC. CpG mutations in the reactive site of human C1 inhibitor. *J Biol Chem*. 1989;264(6):3066-71.

Skriver K, Wikoff WR, Patston PA, Tausk F, Schapira M, Kaplan AP, Bock SC. Substrate properties of C1 inhibitor Ma (alanine 434----glutamic acid). Genetic and structural evidence suggesting that the P12-region contains critical determinants of serine protease inhibitor/substrate status. *J Biol Chem*. 1991;266(14):9216-21.

Stein PE, Carrell RW. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol*. 1995;2(2):96-113.

Stoppa-Lyonnet D, Duponchel C, Meo T, Laurent J, Carter PE, Arala-Chaves M, Cohen JH, Dewald G, Goetz J, Hauptmann G, et al. Recombinational biases in the rearranged C1-inhibitor genes of hereditary angioedema patients. *Am J Hum Genet*. 1991;49(5):1055-62.

Stoppa-Lyonnet D, Carter PE, Meo T, Tosi M. Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1551-5.

Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A et al. Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. 1966;31:77-84.

Széplaki G, Varga L, Valentin S, Kleiber M, Karádi I, Romics L, Füst G, Farkas H. Adverse effects of danazol prophylaxis on the lipid profiles of patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(4):864-9.

Takahashi N, Terakado K, Nakamura G, Soekmadji C, Masuoka T, Yamasaki M, Hirose M. Dynamic mechanism for the serpin loop insertion as revealed by quantitative kinetics. *J Mol Biol*. 2005;348(2):409-18.

Tosi M. Molecular genetics of C1 inhibitor. *Immunobiology*. 1998;199(2):358-65. Review. Erratum in: *Immunobiology* 1999;200(1):166.

van der Graaf F, Koedam JA, Griffin JH, Bouma BN. Interaction of human plasma kallikrein and its light chain with C1 inhibitor. *Biochemistry*. 1983;22(20):4860-6.

Verpy E, Couture-Tosi E, Tosi M. C1 inhibitor mutations which affect intracellular transport and secretion in type I hereditary angioedema. *Behring Inst Mitt.* 1993;(93):120-4.

Verpy E, Couture-Tosi E, Eldering E, Lopez-Trascasa M, Späth P, Meo T, Tosi M. Crucial residues in the carboxy-terminal end of C1 inhibitor revealed by pathogenic mutants impaired in secretion or function. *J Clin Invest.* 1995;95(1):350-9.

Verpy E, Biasotto M, Brai M, Misiano G, Meo T, Tosi M. Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angiodema. *Am J Hum Genet.* 1996;59(2):308-19.

Wagenaar-Bos IG, Hack CE. Structure and function of C1-inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006;26(4):615-32.

Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1058-66. Review.

Weis M. Clinical review of hereditary angioedema: diagnosis and management. *Postgrad Med.* 2009;121(6):113-20.

Whisstock J, Skinner R, Lesk AM. An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem Sci.* 1998;23(2):63-7. Review.

Whisstock JC, Skinner R, Carrell RW, Lesk AM. Conformational changes in serpins: I. The native and cleaved conformations of alpha(1)-antitrypsin. *J Mol Biol.* 2000;295(3):651-65.

Zhang MQ. Statistical features of human exons and their flanking regions. *Hum Mol Genet.* 1998;7(5):919-32.

Zhou A, Stein PE, Huntington JA, Carrell RW. Serpin polymerization is prevented by a hydrogen bond network that is centered on his-334 and stabilized by glycerol. *J Biol Chem.* 2003;278(17):15116-22.

Zhou A, Carrell RW. Dimers initiate and propagate serine protease inhibitor polymerisation. *J Mol Biol.* 2008;375(1):36-42.

Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL. The ancient origin of the complement system. *EMBO J.* 2005;24(2):382-94.

Zuraw BL, Lotz M. Regulation of the hepatic synthesis of C1 inhibitor by the hepatocyte stimulating factors interleukin 6 and interferon gamma. *J Biol Chem.* 1990;265(21):12664-70.

Zuraw BL, Herschbach J. Detection of C1 inhibitor mutations in patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(3):541-6.

APÉNDICES

APÉNDICE 1: Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación y secuenciación de *C1NH*, *F12* y *GAPDH*.

<i>Producto</i>	<i>Posición</i>	Cebadores para la amplificación de <i>C1NH</i> por PCR (directo /reverso)	<i>Tamaño o (pb)</i>
Ex 1-2	-282	5'-TATTGTTACTCATGAAGACGCG	1095
	787	5'-TCTTTCCACCATCTACGAGTG	
Ex 3	2015	5'-CCTTCTCTGAGGAATTAGTGG	892
	2885	5'-CAGAGTTTTACAAGCAATCGTG	
Ex 4	4242	5'-CTCCAAAGCAGGGAATACCC	501
	4722	5'-TACTGTACCTGCCCCGTTAT	
Ex 5-6	8127	5'-TGTTCTTGTTCTGGGTTTAC	889
	8995	5'-GAGAAGGAGAAAAGATAGGGT	
Ex 7	13758	5'-TTGCCCATATTACATAGCTCG	580
	14315	5'-AATACTCTAGAGAATGCTAACTA	
Ex 8	16474	5'-GAGGATCCACGAAGTCCAG	655
	17128	5'-GTGAACTTGAAGTAGAGAAAGC	

<i>Producto</i>	<i>Posición</i>	Cebadores para la secuenciación de <i>C1NH</i> (directo / reverso)	<i>Tamaño (pb)</i>
Ex 1	-90	5'-ATTTGTAAGTGGGCAGTGTCCCGG	271
	156	5'-AAGTCCCAGGTGGAAGCAAGCCTA	
Ex 2	438	5'-AGGGAGGAGGAGGGAATTCGCTAA	294
	708	5'-GCCTGAAGGGTTAATCCTCAGCCA	
Ex 3a	2144	5'-GGACTGTGCCTCGTAGTAAGA	217
	2340	5'-GGTTGTTGAGTTGGTTGTCGG	
Ex 3b	2269	5'-AAGGGAAGGTCGCAACAACAGT	295
	2543	5'-GCCTCTGTTGAATGACTCTCC	
Ex 3c	2482	5'-CTCCTACCCAGCCCACTACT	280
	2741	5'-TCTGGATTGGTGACTCTTATGG	
Ex 4	4318	5'-GCAAGTATCTTTTCATCTCTGCCCTTTGTTG	201
	4489	5'-CTCTGCAGACACTGCCCATTCCTGGGCACT	
Ex 5	8292	5'-GACTCATGCCTCCCTTTCTCAACATACCCC	271
	8533	5'-AATGGGAAGACTAAGTGGCTAAGGGCACCC	
Ex 6	8690	5'-CATTAGAGCAACCCCTCCACCTCTTCCCTC	206
	8866	5'-TTCAAACAGGAGAAGGAAGGTTAAGAACT	
Ex 7	13998	5'-GAAGACTGTAAAGGTGCATCTCTTATTTTC	286
	14254	5'-GCCTGGGAGTAACCCTAAGCTGCCAGAGCT	
Ex 8	16609	5'-TTCTGACTCTGTTTTTCTCTGGTTTTGCC	---

<i>Producto</i>	<i>Posición</i>	Cebadores para la amplificación y secuenciación de <i>F12</i> por PCR (directo / reverso)	<i>Tamaño (pb)</i>
Ex 9	c.802-122	5' ACGTGACTGCCGAGCAAG	392
	c.1018+34	5' CCTCTCGGCTCCTCCTTC	

<i>Producto</i>	<i>Posición (M-13656)</i>	Cebadores para la cuantificación del ARNm de <i>C1NH</i> (directo / reverso)	<i>Tamaño (pb)</i>
Ex 7-8	1002	5' CCCATGATGAATAGCAAGAAGTACC	71
	1073	5' CTGCCCCACCTTGGCTT	

<i>Producto</i>	<i>Posición (NM-002046)</i>	Cebadores para la cuantificación del ARNm de <i>GAPDH</i>: (directo / reverso)	<i>Tamaño (pb)</i>
Ex 1	71	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGG	64
	135	5' AGAGTTAAAAGCAGCCCTGGTG	

APÉNDICE 2 : Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral.

ARTICLE IN PRESS

Letter to the Editor

A new case of homozygous C1-inhibitor deficiency suggests a role for Arg378 in the control of kinin pathway activation

To the Editor:

Hereditary angioedema (HAE) caused by C1-inhibitor (C1-Inh) deficiency is a rare disease with an autosomal dominant pattern of inheritance. Clinically, HAE is characterized by episodes of localized swelling in the limbs, face, gut, or upper respiratory tract.¹ Those affected are generally heterozygous for mutations in the C1-inhibitor gene (*C1NH*), which result in either low levels of circulating C1-Inh (HAE type I) or normal or increased levels of a nonfunctional C1-Inh (HAE type II). Acquired forms of angioedema (AAE) caused by accelerated C1-Inh consumption associated with lymphoproliferative disorders or anti-C1-Inh autoantibodies have also been described.² HAE and AAE clinical manifestations are almost identical, but distinctive biochemical traits of patients with AAE include low amounts of C1q, C1r, and C1s proteins in serum.

C1-Inh is a serum glycoprotein belonging to the serpin superfamily of protease inhibitors, the main function of which is to prevent the activation of the classical pathway of complement, as well as the activation of kinin generation, coagulation, and fibrinolytic cascades.³

Serpins are globular proteins with a conserved structure of 9 α -helices and 3 β -pleated sheets.

Their reactive center is located in an exposed flexible loop referred to as the reactive center loop (RCL). They act on their target proteases by means of a suicide-substrate mechanism involving the cleavage of the RCL and its insertion into β -sheet A. As a result, conformational changes take place in the serpins that ultimately trap and inactivate the targeted protease. Nonphysiological conformations involving RCL insertion and leading to latent states, multimeric states, or both have been attributed to several naturally occurring mutations.⁴

Although more than 200 different heterozygous mutations leading to HAE have been described, only 2 homozygous C1-Inh-deficient subjects, 2 siblings of consanguineous origin carrying the I440S missense mutation, have been identified. Those patients produced a nonfunctional protein and exhibited an unusual disease phenotype, with mild symptomatology and complement consumption. Moreover, they had a total absence of circulating C1q, thus resembling AAE.⁵

Herein we describe a new case of homozygous C1-Inh deficiency in a patient with severe angioedema lacking circulating C1q. Genetic and functional characterization of the patient showed that he carries an R378C substitution and that this is a unique alteration resulting in partial inability of C1-Inh to control kallikrein activation.

The patient is a 33-year-old man who, for the last 10 years, has experienced attacks of angioedema involving the face and extremities. He has had several episodes of laryngeal edema with ventilatory compromise. Biochemical study of the complement proteins (C1-Inh, C4, and C3 antigenic levels) was performed by means of nephelometry. C1-Inh function was determined by a specific colorimetric assay (Berichrom; Siemens, Berlin, Germany), and C1q was measured by means of radial immunodiffusion (The Binding Site, Birmingham, United

Kingdom). Complement profile in the proband revealed values concordant with a C1-Inh deficiency (C1-Inh, 4.38 mg/dL; C1-Inh function, 11%; C4, 1.44 mg/dL) and undetectable C1q, suggesting consumption of the classical pathway of complement. No lymphoproliferative disorder or anti-C1-Inh or anti-C1q autoantibodies were detected. Five additional relatives (all of them asymptomatic) were recruited for this study. Four of them had values consistent with HAE type II, and only 1 relative (GZ7; III.1), a 3-year-old girl, had C1-Inh levels and function within the normal range (see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Once a diagnosis of HAE was established, the proband started prophylactic treatment with the attenuated androgen stanozolol (12 mg/12 hours). Clinical examination was performed, and blood samples were obtained before treatment and at 21 and 28 months after treatment.

After written informed consent was obtained, genetic studies of the *C1NH* locus were performed in all the family members, as previously described.⁵ Sequence analysis revealed the homozygous substitution c.1198C>T (R378C) in exon 7 of the proband. All of his relatives were heterozygous for the mutation (see Fig E1). Data from multiplex ligation-dependent probe amplification of the proband ruled out a possible genomic deletion affecting the *C1NH* gene and confirmed homozygosity (data not shown).

Biochemical characterization of the patient's C1-Inh was done by means of Western blotting of fresh plasma samples. Under nonreducing conditions, native (105 kD) and inactive (cleaved or latent, 96 kD) forms of C1-Inh can be resolved. Interestingly, in the present R378C homozygote, and as reported for the other 2 previously described I440S missense homozygotes,⁵ plasma C1-Inh circulates almost exclusively in its cleaved or latent state. All the heterozygous relatives studied had both forms of circulating C1-Inh (Fig 1).

We studied the functionality of the R378C C1-Inh mutant by measuring complex formation with biotinylated C1s and kallikrein proteases by means of ELISA of plasma samples and supernatants of stably transfected Cos-7 cells. For the plasma assays, samples from an I440S homozygote and a patient with AAE were also analyzed. C1-Inh constructs for the Cos-7 experiments were built on the previously described C1-Inh minigene.⁶ A mutant clone lacking exon 8 (DelEx8) was used as a negative control for all the transfection assays.

The R378C mutant protein binds C1s normally but exhibits a strongly decreased capacity to associate with kallikrein both in plasma and Cos-7 supernatants. No complexes between C1-Inh and target proteases could be detected in the I440S, AAE, and DelEx8 samples (Fig 1).

This unexpected result prompted us to analyze the conformational alterations in the R378C mutant. Cleaved and latent forms of C1-Inh can be distinguished, taking advantage of the previously described, conformational-specific mAbs KII and KOK12 (kindly provided by Dr Diana Wouters, Sanquin Research, Amsterdam, The Netherlands). KII specifically recognizes cleaved/inactivated C1-Inh, whereas KOK12 reacts with cleaved C1-Inh, complexed/latent C1-Inh, or both.⁷ KII signal in the homozygous R378C patient's plasma was higher than in normal human plasma and comparable with that obtained in the I440S homozygote (an HAE type II mutation) and AAE samples.

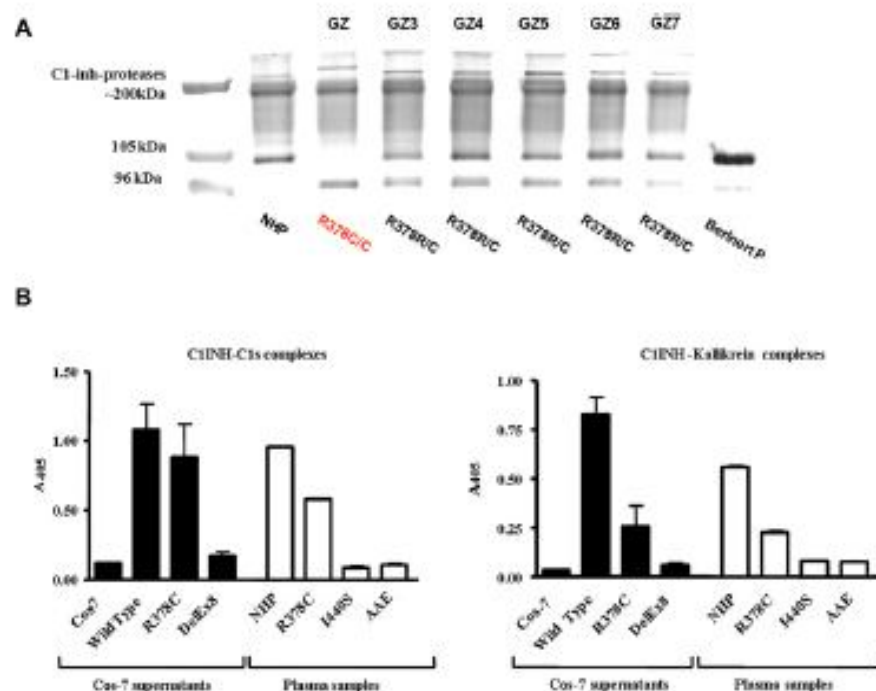


FIG 1. Biochemical and functional studies on the R378C mutant: Western blot of fresh plasma samples of the family members showing the native (105 kD) and cleaved/latent (96 kD) forms of C1-inh. Equal plasma volumes were loaded in each lane. Normal human plasma (NHP) and purified C1-inh (Berlont P) are shown as reference (A). C1-inh's interaction with C1s protease and kallikrein was examined by means of ELISA of Cos-7 cell supernatants (20 ng of protein per lane) and plasma samples (B).

Similar detection patterns were obtained for both mutant proteins when screened with the KOK12 antibody (data not shown).

The results of the I440S homozygote are consistent with complete lack of functionality because of reactive-site cleavage. In the case of the R378C homozygote and considering its normal binding to C1s, the detection of this protein by both the K1 and KOK12 antibodies suggests that the R378C mutation creates a latent-like epitope recognizable by these 2 antibodies. Because only the 96-kD band was detected in this patient by means of Western blotting, we hypothesize that the C1-inh mutant might undergo a partial insertion of the RCL into β -sheet A.

One striking similarity among both the R378C and I440S families is the absence of HAE-related symptomatology in the heterozygous subjects. However, unlike the I440S homozygotes, who only reported mild clinical manifestations, the R378C homozygous patient described here did have recurrent and severe attacks of angioedema before treatment. Yet on prophylactic treatment with stanazolol, a decrease in the frequency and severity of symptoms was achieved in the R378C homozygote. This clinical amelioration coincided with a partial recovery of the patient's complement profile. Specifically, C1-inh, C4, and C2 concentrations were recovered to normal levels in the 2 samples analyzed after attenuated androgen therapy (posttreatment samples 1 and 2). C1q concentrations remained undetectable in posttreatment sample 1 and were only restored to normal values (10.3 mg/dL) in the second posttreatment sample (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). A broader discussion can be found in Appendix E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

Our results further characterize the complement profile associated with homozygous mutations in the *C1NH* gene and suggest that suspicion of homozygous deficiency cannot rely on the presence of mild symptomatology. Additionally, we provide insights on the biochemical function of the R378C mutation, a substitution that induces a latent-like conformation of C1-inh that specifically inhibits kallikrein binding, suggesting that the Arginine 378 position is of strategic importance for C1-inh control of kinin formation.

We thank Dr Angeles Rico Díaz (Hospital Juan Canalejo, A Coruña, Spain) and Dr Gabriel Banderas (Centro de Salud Collado Villalba, Madrid, Spain) for referring the patients and Dr Diana Wouters (Department of Immunopathology, Sanquin Research, Amsterdam, The Netherlands) for providing the K1 and KOK12 mAbs.

Alberto López-Lera, MS^{a,b,c}
Bertrand Favre, PhD^d
Rocio Mena de la Cruz, MS^{a,b,c}
Sofia Garrido, BS^{a,c}
Christian Drouot, PhD^d
Margarita López-Trascasa, PhD^{a,b,c}

From ^athe Immunology Unit, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ^bCentro de Investigaciones Biomédicas en Red (CIBERER, Madrid, Spain) U-754; ^cHospital La Paz Health Research Institute (IdIPAZ, Madrid, Spain); and ^dGREP/UMC-IMAG CNRS UMR 5525, Université J. Fourier and Unité d'Exploration de l'Angioedème, CHU Grenoble, France. E-mail: a_lopezlera@iia.hsc.es. Supported by Ministerio de Educación y Ciencia SAF2006-02948 and CIBERER Intramural 09758.2.

Disclosure of potential conflict of interest: A. López-Lera receives research support from the Biomedical Network Research Center on Rare Diseases and the Ministry of Education and Science. R. Mena de la Cruz receives research support from the

ARTICLE IN PRESS

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME ■■■, NUMBER ■■

LETTER TO THE EDITOR 3

Biomedical Network Research Center on Rare Diseases. M. López-Trascasa receives research support from the Biomedical Network Research Center on Rare Diseases and the Ministry of Education and Science. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Grigoriadou S, Longhurst RJ. Clinical immunology review series: an approach to the patient with angio-oedema. *Clin Exp Immunol* 2009;155:367-77.
2. Cugno M, Castelli R, Cicardi M. Angioedema due to acquired C1-inhibitor deficiency: a bridging condition between autoimmunity and lymphoproliferation. *Autoimmun Rev* 2008;8:156-9.
3. Cugno M, Zanichelli A, Foieni F, Caccia S, Cicardi M. C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends Mol Med* 2009;15:69-78.
4. Eldering E, Verpy E, Roem D, Mero T, Tosi M. COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J Biol Chem* 1995;270:2579-87.
5. Blanch A, Roche O, Urrutia I, Gamba P, Fontès G, López-Trascasa M. First case of homozygous C1 inhibitor deficiency [published erratum in *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:745]. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1330-5.
6. Vink G, Lynch NJ, Dupouchet C, Lehouard TM, Milon G, Stover C, et al. In vivo biosynthesis of endogenous and of human C1 inhibitor in transgenic mice: tissue distribution and colocalization of their expression. *J Immunol* 2002;169:5948-54.
7. Najjar JH, Hajjbreghs CC, van Mierlo GM, Hack CE. Inactivation of C1-inhibitor by proteases: demonstration by a monoclonal antibody of a neoepitope on inactivated, non-complexed C1-inhibitor. *Immunology* 1987;61:387-9.

doi:10.1016/j.jaci.2010.07.037

APPENDIX E1

The results in the present work are in agreement with previous reports concerning attenuated androgen treatment in patients with HAE. Androgens are known to increase C1-Inh and C4 antigenic levels in plasma of heterozygous patients with HAE.^{E1} Moreover, it has been shown that androgen treatment increases C1-Inh mRNA expression in PBMCs.^{E2} Increased levels and function of C1-Inh might restore local homeostasis between the inhibitor and its target proteases, thus controlling the activation of the classical pathway of complement in the focus of edema. Nevertheless, clinical and laboratory experience regarding androgen use in patients with HAE is restricted to heterozygous situations, in which the wild-type allele can be driven to increment C1-Inh production. To date, reports on the prophylactic intake of androgens in homozygous patients with HAE are lacking.

Of note, the homozygous R378C substitution markedly reduces but does not completely suppress C1-Inh synthesis and secretion. This basal expression of the R378C allele provides a source for the low but detectable levels of C1-Inh in the patient before treatment and makes the mutant allele susceptible to androgen upregulation, explaining the patient's good response to attenuated androgen therapy.

To our knowledge, the R378C substitution described here is the first mutation outside of the RCL reported to alter C1-Inh specificity. The R378 residue is located in the gate region, in the turn between 2C helix and the S6A strand of β -sheet A (Protein Data Bank accession 2OAY). The importance of this region is highlighted by studies on the model serpin α -1-antitrypsin (A1AT), in which, on interaction with proteases, the RCL inserts into β -sheet A and is stabilized by a salt bridge formed between amino acids K290 and E342. The disruption of this salt bridge in the Z variant of A1AT (carrying the E342K mutation) reduces the stability of the molecule and induces its intracellular multimerization by means of a loop-sheet insertion mechanism.^{E3}

Based on structural models of C1-Inh, it is predictable that R378 also forms a salt bridge with E429. In the R378C mutant the positively charged arginine (homologous to K290 in A1AT) is replaced by the neutral cysteine at position 378 and probably prevents salt bridge formation with subsequent alteration of the protein conformation.

The specific impairment in kallikrein activation control found in the R378C mutant sheds more light on the pathogenesis of HAE. The situation seems to be opposite to that of the family reported by Wisniewski et al.,^{E4} in which an Ala443Val substitution in C1-Inh prevented C1r binding but maintained full inhibitory capacity to kallikrein and coagulation factor XII.^{E5,E6} Although the R378C homozygous patient has had recurrent episodes of edema, no family member with the Ala443Val mutation, all of whom also had complement system activation, ever had symptoms of HAE, suggesting that classical complement activation alone does not result in angioedema.

REFERENCES

- E1. Gelfand JA, Shestak RJ, Ailing DW, Frank MM. Treatment of hereditary angioedema with danazol. Reversal of clinical and biochemical abnormalities. *N Engl J Med* 1976;295:1444-8.
- E2. Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. Increased expression of C1-inhibitor mRNA in patients with hereditary angioedema treated with danazol. *Immunol Lett* 2003; 86:271-6.
- E3. Jancianskiene S, Eriksson S, Calleja F, Malliya M, Zhou A, Seyama K, et al. Differential detection of PA5-positive inclusions formed by the Z, S, and M variants of α -1-antitrypsin. *Hepatology* 2004;40:1203-10.
- E4. Wisniewski JJ, Knäuper TC, Yike I, Dearborn DG, Navey RL, Naff GH. Unique C1 inhibitor dysfunction in a kindred without angioedema. I: a mutant C1 INH that inhibits C1r but not C1s. *J Immunol* 1994;152:3199-209.
- E5. Zahedi R, Bissler JJ, Davis AE 3rd, Andreola C, Wisniewski JJ. Unique C1 inhibitor dysfunction in a kindred without angioedema. II. Identification of an Ala443 \rightarrow Val substitution and functional analysis of the recombinant mutant protein. *J Clin Invest* 1995;95:1299-305.
- E6. Zahedi R, Wisniewski JJ, Davis AE 3rd. Role of the P2 residue of complement 1 inhibitor (Ala443) in determination of target protease specificity: inhibition of complement and contact system proteases. *J Immunol* 1997;159:583-8.

ARTICLE IN PRESS

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME ■■■, NUMBER ■■

LETTER TO THE EDITOR 3.62

Patient Code	Age (y.o.)	C4 (14-47 mg/dl)	C3 (77-120 mg/dl)	C2 (45.23 A.U.)	C1-Inh (14-35 mg/dl)	C1-Inh Function (70-130%)	C1q (10-30 mg/dl)	Genotype	HAE Type
GZ	33	1.44	141	ND	4.38	11	ND	R378C/C	I
GZ3	28	21.70	119	39.7	24.90	44	12	R378R/C	II
GZ4	27	14.50	125	52.25	19.70	34	14.2	R378R/C	II
GZ5	37	15	119	61.89	14.70	52	13.8	R378R/C	II
GZ6	6	16.40	125	54.73	23.50	36	14.6	R378R/C	II
GZ7	3	12	97	41.19	18.9	100	12	R378R/C	-

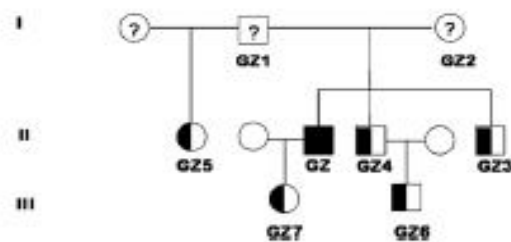


FIG E1. Complement profile and family tree. The reference values were obtained from a series of healthy donors. The first generation was not available for the study. ND, Not detectable.

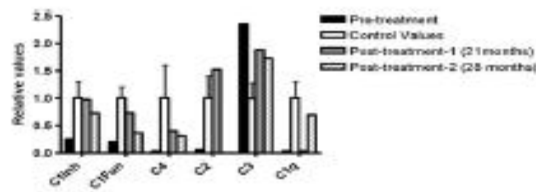


FIG E2. Follow-up of complement profile after treatment with stanazolol. C1-inh levels and function and C4 and C2 levels were markedly increased in plasma of the R378C homozygote after treatment with stanazolol. C1q increased to normal levels only in the second posttreatment sample 28 months after the beginning of stanazolol intake. All the measures are expressed as a percentage of the reference values in each case.

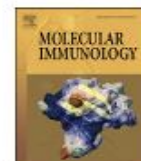
APÉNDICE 3 : Otras publicaciones no relacionadas con esta tesis doctoral.

Molecular Immunology 46 (2009) 2340–2347



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimmMolecular characterization of three new mutations causing C5 deficiency in two non-related families[☆]Alberto López-Lera, Sofía Garrido, Rocío Mena de la Cruz, Gumersindo Fontán, Margarita López-Trascasa^{*}

Unidad de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) U754, Hospital Universitario "La Paz", Paseo de la Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2009

Received in revised form 27 March 2009

Accepted 27 March 2009

Available online 2 May 2009

Keywords:

Complement deficiency

C5

de novo mutation

Splicing enhancer

Immunodeficiency

Meningitis

ABSTRACT

Deficiencies in complement components are rare diseases whose diagnosis is often underestimated. In addition, in only a few cases molecular studies have been carried out for the characterization of the underlying genetic defects. To date, studies involving C5-deficient patients are scarce.

The aim of the present report is to characterize the biochemical and molecular complement deficiency in two non-related families with one or more members showing no detectable hemolytic complement activity (CH50 < 50 U/ml) and reporting a history of several episodes of meningitis. Protein deficiency was assessed by means of hemolytic assays, bi-dimensional double immunodiffusion, ELISA and Western blot of patients' sera. Molecular studies were carried out by PCR and RT-PCR of DNA and RNA, respectively, both extracted from fresh blood samples of each family member. In Family A, only the *propositus* had complete C5 deficiency. Molecular studies showed that he was heterozygous for two changes in the C5 gene. One of the mutations was also carried by the father (c.1883_1884AG < CTCT) and the second (c.2536T > C, Y846H) was a *de novo* mutation. In Family B, the two C5-deficient members share the homozygous nonsense mutation c.892C > T (Q298X) in exon 9.

The characterization of these new mutations is interesting in order to elucidate structure–function relationships in the C5 gene and it also helps to understand the molecular basis of this uncommon deficiency. Moreover, this report highlights the importance of complement screening in cases of repeated meningococcal infections in order to establish its involvement and to consider adequate clinical recommendations such as prophylactic antibiotics or meningococcal vaccines.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The complement system is a set of soluble and membrane-bound proteins that take part both in the innate and adaptive immunity of vertebrates. Proteolytic activation of the complement cascade triggers a wide range of cellular responses, from apoptosis to opsonization.

Under physiological conditions, complement promotes the clearance of immune complexes, an important means of removing antibody-coated bacteria. Complement defects increase susceptibility to infection and are frequently associated with autoimmune disorders. The complement system is closely linked to adaptive immunity through its activation and recognition of specific receptors on several cell types' surfaces. Moreover, a normally func-

tioning complement system is also required for physiological tissue regeneration and repair (Ross and Densen, 1984; Figueroa and Densen, 1991; Mastellos et al., 2001).

Three different pathways are implicated in complement activation: the classical pathway (activated by the recognition of immunocomplexes by C1q), the alternative pathway (based on spontaneous activation of C3 on the pathogen surface lacking inhibitory factors) and the lectin pathway (homologous to the classical pathway, but using lectins and ficolins instead of C1q). These three phylogenetically related proteolytic systems converge in C3, which initiates the so-called terminal pathway (C5–9) by cleaving C5.

Human complement component C5 is a plasma glycoprotein (Mr: 196 kDa) composed of two disulfide-bound polypeptide chains (C5 α and C5 β , 115 and 75 kDa, respectively). This component is mainly synthesized in the liver, monocytes and lymphocytes as an intracellular single chain precursor of 1976aa, including a leader peptide and an arginine-rich linker region (RPRR) connecting the α and β chains (Ooi and Colten, 1979; Carney et al., 1991).

[☆] Supported by Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-02948) and Ministerio de Sanidad (Centro de Investigación Biomédica en Red, CIBERER).

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 912071463; fax: +34 917277095.

E-mail address: mlopeztrascasa.hulp@salud.madrid.org (M. López-Trascasa).

Upon activation by the classical/lectin or alternative pathways' convertases, the precursor form of C5 is cleaved to yield two proteolytic fragments:

- C5a is the N-terminal fragment of the alpha chain. It is a potent anaphylotoxin that induces smooth muscle contraction, increases vascular permeability, basophil and mastocyte degranulation and lymphocyte recruitment to the site of infection (Gerard and Gerard, 1994). Moreover, C5a modulates the acute phase of the hepatic response and globally increases the immune response by inducing the synthesis of tumor necrosis factor (TNF) and interleukins (IL) 1 β , IL-6 and IL-8 in certain cell types (Lambris et al., 1998).
- C5b, containing the binding site for C6, initiates the lytic pathway upon binding of the late complement components, leading to lysis of the pathogen (Ware and Kolb, 1981).

C5 proteolytic fragments have been implicated in inflammatory processes such as sepsis (Riedemann et al., 2003) and fetal injury in antiphospholipid syndrome (Girardi et al., 2003). Besides, several candidate gene searches and genome-wide analyses have identified polymorphisms in the TRAF1–C5 genomic region as a relevant modifier of susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (Atkinson, 2003; Plenge et al., 2007).

The C5 coding gene (NC_000009.10) is located on chromosome 9q34.1 and spans a genomic region of 79 kb. Its open reading frame, composed of 41 exons, codes for C5 α (exons 1–16) and C5 β (exons 17–41) and gives rise to a 6 kb mRNA (NM_001735.2) translated into a pre-C5 protein (in β – α orientation) which is proteolytically processed into the mature, two-chain C5 form by the removal of the RPRR region. In addition, two truncated transcripts using alternative splicing and polyadenylation signals have been reported (Haviland et al., 1991).

C5 deficiency (C5D, MIM#120900) is a rare autosomal recessive disease that has previously been reported in several families from different ethnic origins. It is commonly associated with severe and recurrent Gram-negative infections, particularly meningitis and extragenital gonorrhoea by *Neisseriae* species (Peter et al., 1981). Furthermore, studies in C5-deficient mice have demonstrated a significant genetic link between C5 deficiency and elevated airway hyper-responsiveness in experimental asthma. This suggests that C5 plays an important protective role in allergic lung disease by suppressing inflammatory responses and Th2 effector functions (Karp et al., 2000; Drouin et al., 2004). From a clinical point of view, as with other complement terminal components deficiencies, meningococcal vaccination and prophylactic antibiotics should be considered for the treatment of C5-deficient patients.

To date, only four mutations resulting in C5 deficiency in humans have been described at the molecular level (Wang et al., 1995; Delgado-Cervino et al., 2004; Pfarr et al., 2005) and in every case, the affected members belonged to consanguineous families. In two of these families, the responsible mutation was found to be heterozygote, and a second, uncharacterized molecular defect accounting for the complete C5 deficiency was speculated (Wang et al., 1995). Pfarr et al. (2005) suggested the association between this deficiency and mRNA alterations were caused by the disruption of an exonic splicing enhancer (ESE) in exon 10. Previous studies in our group allowed us to characterize the first homozygous mutation in a C5-deficient family (Delgado-Cervino et al., 2004).

The aim of the present work was to characterize the molecular defects underlying the complete C5 deficiency in two non-related families with several members showing undetectable hemolytic complement activity.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Family A: The proband (AP.1), his parents (AP.2, father; AP.3, mother) and brothers (AP.4 and AP.5) were referred to Hospital Universitario La Paz, with suspected complement deficiency. There was no family history of consanguinity.

AP.1 had a clinical history of repetitive meningococcal infections from infancy. During the last episode, his cerebrospinal liquid cultures revealed *Neisseria meningitidis* group B infection. Neither parents nor brothers suffered from meningococcal infections.

Family B: Three members from an Italian family, the proband (BP.1), his sister (BP.2), and his brother (BP.3), were referred to Hospital Universitario La Paz. Both BP.1 and BP.2 had a clinical history of meningococcal infections from infancy, whereas BP.3 remained healthy. Their parents were deceased and had a consanguineous relationship.

Blood samples from all available members of both families were obtained for serological and molecular studies and stored at -80°C until used. All signed an informed consent form for these studies.

2.2. DNA and RNA extraction

DNA and RNA samples were obtained from peripheral blood mononuclear cells using Gentra Puregene BloodCore (Gentra systems, Minneapolis, MN) and RNeasy Midi (Qiagen, Valencia, CA) kits, respectively, and following the manufacturer's instructions.

2.3. Complement studies

Serum levels of C3 and C4 were measured by nephelometry. Classical pathway function was evaluated by hemolytic assay (CH50) as described by Phimister and Whaley (1990). The presence of each complement component was assessed by Ouchterlony double immunodiffusion with polyclonal antibodies.

2.4. C5 measurement and functional studies

C5 levels were determined by means of an ELISA sandwich method as previously described (Delgado-Cervino et al., 2004). The presence of C5 in serum was analyzed by Western blot. Briefly, 5 μL of 1:10 diluted serum samples from all family members, a pool of normal human sera, a commercial human serum with known C5 concentration, (Complement Std. Serum, DadeBehring), purified normal C5 and molecular weight markers (Rainbow, Amersham, UK) were run on a 8% SDS-PAGE gels under non-reducing conditions. After electrophoresis, samples were transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with a murine anti-C5 mAb (Quidel) diluted 1:5000. A biotinylated antimouse IgG (Dako) diluted 1:2000 was used as secondary antibody. Later, the membrane was incubated with alkaline phosphatase labelled-streptavidin (Sigma) and the reaction was developed with NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate). In addition and following the protocols described in Delgado-Cervino et al. (2004), functional C5 in serum was analyzed using a C5 specific hemolytic assay.

2.5. Molecular study of the C5 gene

Genetic study of all family members was approached by RT-PCR amplification of six overlapping fragments of the C5 mRNA (Fig. 1), following a protocol modified from Delgado-Cervino et al. (2004). Briefly, total cDNA from patients and controls was synthesized from 1 μg of total RNA in 20 μL reactions with 0.5 μg Oligo(dT)_{12–18}, 0.2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂ and 50 units of

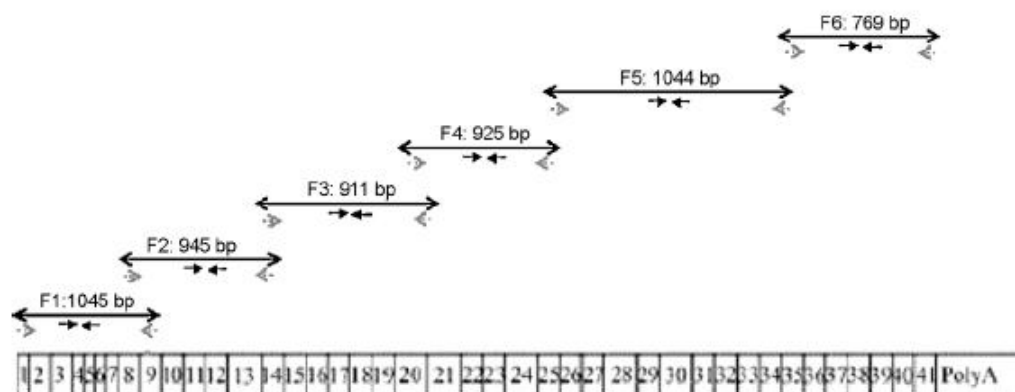


Fig. 1. mRNA analysis. Strategy for the generation of overlapping cDNA fragments. Sequences of the primers used in each case are described in Table 1. Grey thick arrows (→) denote external primers (F1–F6) and black thin (→) arrows represent internal primers (F1i–F6i).

Table 1
Primers list.

Fragment	Sense	Antisense
RT-PCR external primers		
1	ctactcccaaccatgggcc	tgccagggtattctgctcttc
2	catctggagtgac ggtgctgg	cattccaggtggcatttaagag
3	atgtggcaaccagctccagg	ctttcc gaagtgcagattcc
4	gaactgtttacaactatagg	tccaatca cagtaaaaggctg
5	tcaaccaataaaattacagg	gaaatcactggagggaatc
6	agacttaaaagccctgtgg	caacaggagttccataagtc
RT-PCR internal primers		
1i	atgacgactgaagccagcc	ctaccatgtcaactctgatcc
2i	cactggagtgac ggtgctgg	ttgctcggtaacctccctg
3i	gcgttaataatgatgaacc	acacaacattcagtgaaagc
4i	gtaggtgagatctgtctgc	agctcgcctctgcactcc
5i	gatataaattatgttaacc	tgccattgagtgctctgg
6i	gcgtgcaagtgtgtagaagc	ctgcagagattgtcagatcc
Genomic primers		
Exon 9	tccgaataaactctccttttc	cacacacacacacacacact
Intron 14A	agtcacaagaggagccaaa	tgctgtaagactgttttga
Intron 14B	tcgaggctgaatgtctttg	cca cagcc cagatcactctt
Exon 15	catctcaatgtgtctcaac	ggcacaatgatcaatgggaat
Exon 20	gcttccacttgggctga	tcagaaaaccagagaatgttcc

External (F1–F6) and internal (F1i–F6i) primers used for cDNA synthesis of the six overlapping fragments; genomic DNA primers employed for the analysis of the regions containing mutations.

SuperScript II RT, included in the SuperScript™ First-Strand kit (Invitrogen, Barcelona, Spain) as recommended by the manufacturer. The 6 fragments, ranging from 750 to 1050 bp in length, were amplified from the total cDNA using 0.25 µg of each fragment-specific primer pair, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs and 2.5 units of AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Madrid, Spain). PCR reactions were started with 12' at 94 °C, followed by 35 cycles of 15" at 94 °C, 30" at 50 °C and 1'40" at 72 °C and a final extension of 10' at 72 °C. The nucleotide sequence of each primer pair used is detailed in Table 1.

Amplified fragments were purified from 1% agarose gels using the Gel Extraction Kit (Qiagen, Madrid, Spain) and sequenced with two pairs of specific primers for each fragment (internal and external primers) using BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems,

Madrid, Spain). Sequencing products were analyzed in an automated 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

A sequence tagged site (STS) analysis was carried out for polymorphic regions flanking the C5 gene. For this purpose, primer pairs D9S103-S: 5'-ATAGACTTCCAGACAGA TAG-3'/D9S103-AS: 5'-CCTCTCTCATTCTGGTACT-3' and D9S1823-S: 5'-AA CTACCA-TTGACATTATTATGTGC-3'/D9S1823-AS: 5'-GTTGGATTATCTTGGAT-TC-3' were used. PCRs were developed as described above and with an annealing temperature of 59 °C.

Exonic splicing enhancer motifs were analyzed using Rescue ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) algorithms.

2.6. Molecular modeling

A protein structural model of the Y846H mutant was obtained by side chain substitution using Deep View Swiss-PDB viewer (<http://expasy.org/spdbv/>) upon PDB accession 3cu7 and visualized using PyMOL software (DeLano, 2002).

3. Results

3.1. Complement studies

Classical pathway activity, measured as CH50, was undetectable in AP.1, BP.1 and BP.2 sera and was within the normal ranged in all their relatives. A qualitative screening for any complement component deficiency by double immunodiffusion revealed the absence of C5 in AP.1 (Fig. 2x), BP.1 and BP.2 (data not shown). The deficiency was exclusively found in these patients, as ascertained by means of ELISA and Western blot of both family members' sera (Fig. 3). Furthermore, C5-specific hemolytic activity was undetectable in AP.1, BP.1 and BP.2 and could be restored to normal levels by adding purified C5 (data not shown). Besides, components C3 and C4 were normal in all of the screened individuals (Fig. 3, bottom).

3.2. Molecular study of the C5 gene

Family A: A first RT-PCR analysis gave the expected sizes for all cDNA fragments except AP.1 and AP.2's fragment 3 (F3), where a



Fig. 2. Ouchterlony double immunodiffusion. Upper row: AP.1; propositus; NHS; normal human serum; lower row: antisera used to detect each complement component.

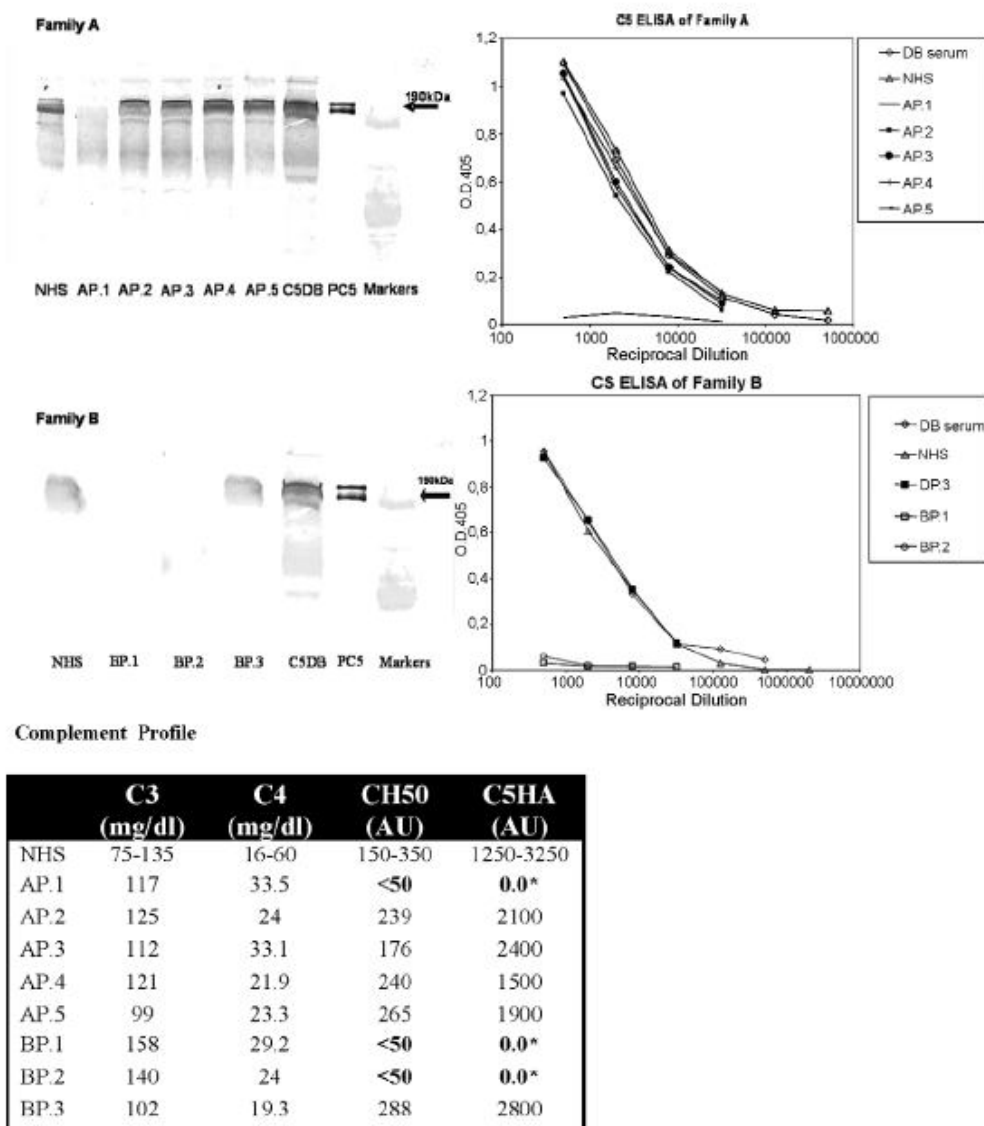


Fig. 3. Analysis of C5 in serum of families A and B. Western blot, ELISA and complement profile of each family member are shown. NHS: normal human serum; PC5: purified C5 (Calbiochem); C5DB: C5 calibrated serum (Dade Behring). In C5-deficient subjects, * denotes undetectable complement hemolytic activity only restored by the addition of purified C5 (data not shown).

double band was observed (see Fig. 4). Besides the 911 bp expected band, a second amplification product of 780 bp was found, suggesting the presence of a genomic DNA deletion or a splicing defect in both family members. By comparing the sizes obtained in AP.1 and AP.2 for the overlapping fragments F3, extending over exons 14–21 (double band) and F3i–4i, spanning from exons 17 to 24 (a single band of the expected 925 bp), it was inferred that the responsible molecular defect must be located in the 5' region of F3 (Fig. 4). In addition, direct sequencing of the 780 bp cDNA fragment revealed the absence of exon 15, whereas the 911 bp band sequence was normal. By means of sequencing the corresponding genomic region, the heterozygous substitution c.1883_1884AG > CTCT was found in AP.1 and AP.2's exon 15, while any other mutation in canonical splicing sequences (exon–intron boundaries and intron 14 branch point and polypyrimidine tract) was ruled out. These results suggested that the mutation was affecting a non-canonical splicing sequence. We used the Rescue ESE program to evaluate whether

the substitution could be affecting an exonic splicing enhancer sequence. Four overlapping hexamers (GAAGAG, AGAAGA, GAGAAG and AGAGAA) were identified as putative ESEs in the region altered by the mutation. Moreover, no candidate ESE was detected on the mutated sequence, supporting the idea that c.1883_1884AG > CTCT substitution was disrupting an exonic splicing regulator. The lack of exon 15 in the resulting mRNA alters the reading frame and leads to the generation of a truncated transcript lacking the whole alpha chain coding sequence. The corresponding truncated peptide could not be detected in carriers' sera. A second heterozygous mutation located in exon 20, the missense change c.2536T > C (Y846H), was found exclusively in AP.1 (Fig. 5). This substitution could not be detected in 50 normal individuals with the same ethnic background.

Sequence tagged site analysis of C5 gene flanking markers D9S103 and D9S1823 showed normal segregation in AP.1, AP.2 and AP.3 (data not shown).

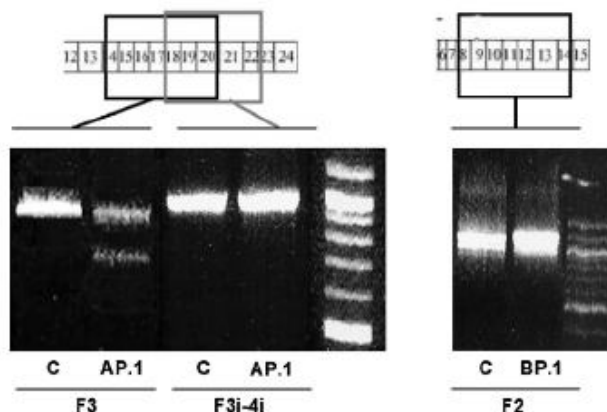


Fig. 4. Analysis in 2% agarose gel of the relevant fragments in each family. Left panel shows fragments 3 (F3, black box in the schematic view) and F3i and F4i (grey box in the schematic view) after RT-PCR in AP.1 and controls (C). Right panel shows fragment 2 (F2, black coloured box in the scheme) after RT-PCR of BP.1 and controls (C).

Family B: RT-PCR analyses gave the expected sizes for the six cDNA fragments (Fig. 4). Fragment 2 sequencing showed the homozygous change c.892C > T in exon 9 of BP.1 and BP.2, not being present in BP.3 nor in the 50 controls screened (Fig. 5).

3.3. Molecular modeling

The structure of C5 has recently been resolved by X-ray diffraction (Fredslund et al., 2008) and that allows us to interpret the effects of mutations on protein structure and function. For this purpose, the Y846H mutant protein model was generated upon PDB accession 3cu7. Residue Y846 is located in the α -chain of the protein, inside the α -2-macroglobulin domain and close to residues Y254, F255 and Y256 of the β -chain. The Y846H mutation seen in our patient does not seem to have any significant effect on global folding of the polypeptide backbone nor in the relative distances with the three closest residues mentioned above (Fig. 6). Moreover, global electrostatic charge of the mutant protein is identical to that of the wild type. Taking these facts into account, we can conclude that Y846H mutation does not lead to perturbation of the protein structure.

4. Discussion

Deficiencies in the terminal components of the complement pathway are known to increase susceptibility to Gram-negative infections, particularly to those of *Neisseriae* species (Peter et al., 1981). C5 deficiency, whose prevalence in the population is unknown, is a clear example of this kind of molecular defect. C5 is essential not only for the innate immune response, as it initiates the assembly of the membrane attack complex, but it is also responsible, through the fragments generated upon its activation, for a wide range of proinflammatory, chemotactic and anaphylactic responses, which are necessary for correct adaptive immunity modulation (Walport, 2001a,b).

The substitution c.1883_1884AG > CTCT, found in exon 15 of AP.1 and AP.2, disrupts the sequence of a putative exonic splicing enhancer (ESE). This alteration in a non-canonical splicing regulator produces exon 15 skipping in the mature mRNA of both family members, and changes the reading frame of this transcript leading to the introduction of a premature stop codon in exon 16. The resulting protein, lacking the whole α chain, seems to be unstable and susceptible to intracellular degradation, as no C5 protein is observed in the *propositus*' serum. In order to rule out any other mutation causing exon 15 skipping, full intron 14 was sequenced

and no alteration was found. As stated in recent reviews, point mutations in non-consensus splicing sequences are a potentially disease-causing molecular defect that is generally underestimated (Cartegni et al., 2002). ESEs are regulatory elements located in coding sequences that seem to be essential for the maintenance of correct splicing patterns. They act as binding sites for sequence specific serine-arginine rich (SR) proteins, promoting the inclusion of the ESE-harboring exons in mature mRNA (Ryther et al., 2003). Pfarr et al. (2005) previously characterized a C5 deficiency due to the homozygous disruption of an ESE located in exon 10. The presence of several ESEs in the same gene seems to be quite frequent. Actually, there is evidence that suggests the presence of ESEs in the majority of human exons (Fairbrother et al., 2002) and that ESE-affecting mutations can cause disease by generating truncated transcripts or proteins lacking functional domains (Blencowe, 2002). As reported in previously characterized C5 mutations, the heterozygous carriers show significantly reduced C5 serum levels. In the case of the c.1883_1884AG > CTCT heterozygous carrier (AP.2), C5 serum concentration is about 60% of that of the control population. That slight deviation from the expected 50% value, in addition to the fact that the homozygous patient shows a markedly reduced, but detectable expression level (3–6% of control individuals) as shown in Fig. 3, suggests that the allele bearing the c.1883_1884AG > CTCT splicing mutation maintains residual levels of expression. This is in agreement with the findings by Pfarr et al. (2005), where the homozygous carriers of the ESE-disrupting mutation in exon 10 of C5, also showed very low, but detectable protein levels.

No test of anaphylactic, chemotactic or proinflammatory functionality has been performed, so we cannot rule out that these C5 non-lytic activities could be affected in heterozygous carriers. However, the absence of disease in AP.2 and his normal lytic activity are in accordance with the hypothesis that these functions remain unaltered.

The second mutation described in Family A, present only in the *propositus*' maternal allele, the missense substitution c.2536T > C (Y846H), affects the α 2M domain, located in the α chain of the protein. This domain, also found in components C3 and C4 of the classical pathway, belongs to the I39 protease inhibitor family. As this nucleotide change had not been previously described and no other obvious mutation was found within the family, a STS analysis was carried out in the *propositus* and his parents. The results of this analysis showed normal segregation, therefore an anomalous chromosomal segregation or non-homologous recombination can be discounted as the cause of the deficiency.

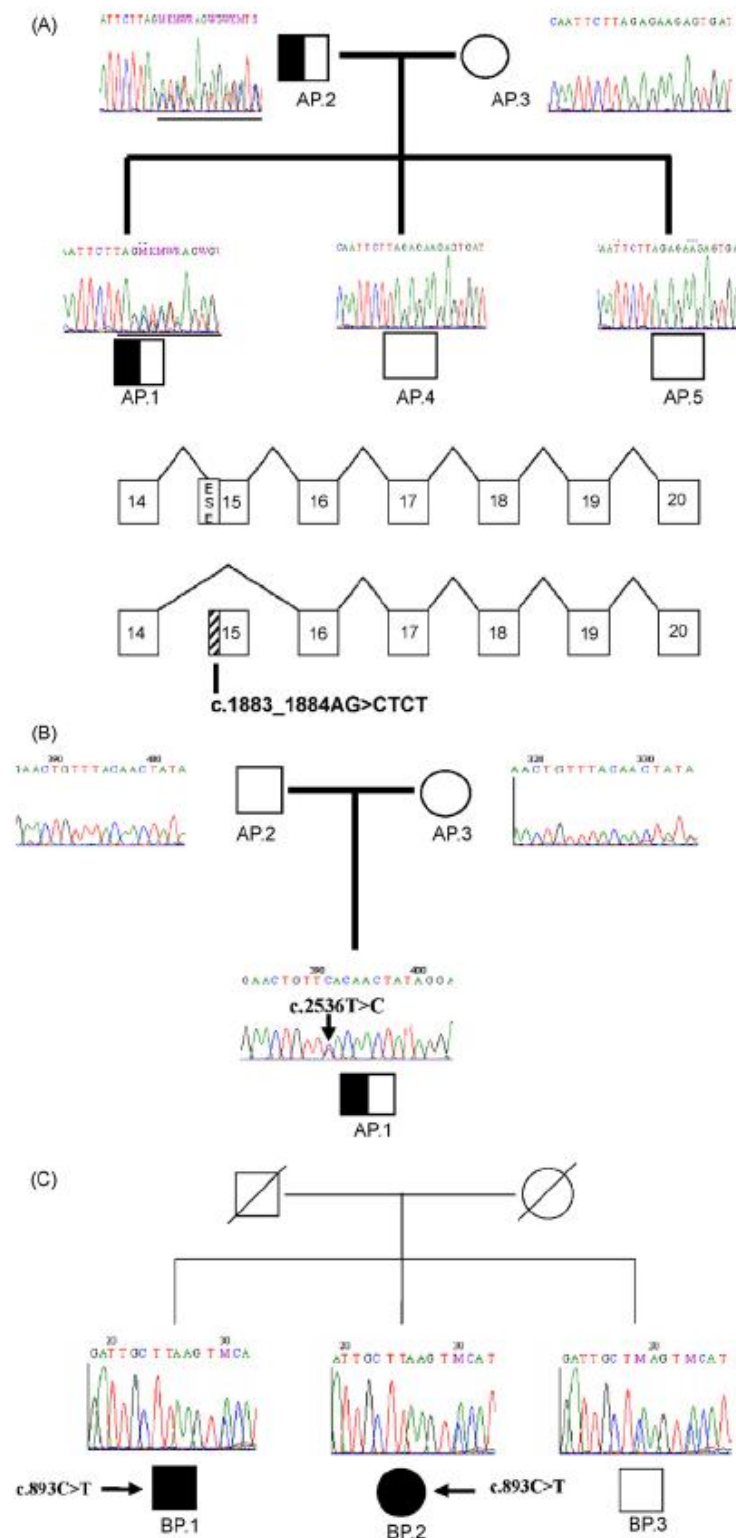


Fig. 5. Familial trees showing the segregation of each mutation in the two families. In Family A, the heterozygous substitution c.1883_1884AG > CTCT is carried by the proband (AP.1) and his father (AP.2), and generates a mRNA lacking exon 15 due to an ESE sequence alteration, as schematically shown in the at the bottom (A). The missense mutation c.2536T > C is exclusively found in AP.1 (B). In Family B, the homozygous nonsense mutation c.892C > T is present both in BP.1 and BP.2 (C).

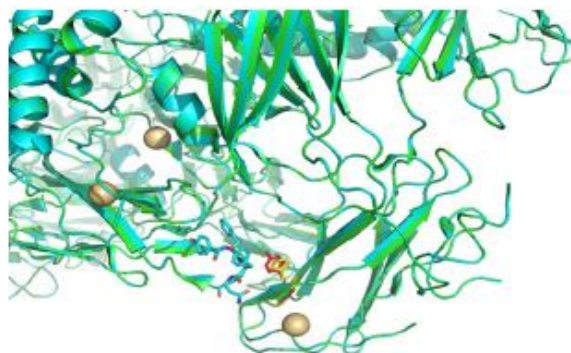


Fig. 6. *In silico* structural models of the mutant protein. No obvious structural constraint can be detected at the model's resolution. The aminoacid change caused by the Y846H substitution does not generate nor disrupt any structural contact at a resolution of 4Å. Wild type Tyr residue is shown in red; mutant His residue is shown in yellow. Closest residues (Y254, F255 and Y256) are also labelled in blue. Brown spheres represent Cadmium ions added as chemical ligands.

The total absence of C5 in AP1 serum suggests that Y846H substitution blocks protein production, either pre- or post-translationally. Structural models for the mutant protein were developed based on PDB accession 3cu7 and no obvious structural change was observed at the model's resolution (Fig. 6). The closest residues to position 846 (Y254, F255 and Y256) were identified and their distances to that position remain unaltered in the mutant model. Moreover, the global charge of the region surrounding the mutation was almost identical in the wild type and mutant protein models, therefore structural or folding defects leading to protein degradation are not likely to cause the C5 deficiency. We cannot rule out, however, alterations in the mutant protein secretory pathway or the RNA harbouring c.2536T>C substitution to be unstable or susceptible to nuclease degradation.

The mutation found in Family B, the substitution c.892C>T (Q298X) located in exon 9, disrupts the transcript's reading frame by introducing a stop codon, thus explaining the complete lack of C5 protein in the homozygous carriers (BP.1 and BP.2).

5. Conclusion

In conclusion, we have described three non-previously characterized mutations causing C5 deficiency. Two of them, affecting Family A, are present in heterozygosis: c.1883-1884AG>CTCT is associated with the disruption of a putative exonic splicing enhancer and c.2536T>C (Y846H) is the first *de novo* mutation identified in the C5 gene. The other mutation presented here, the change c.892C>T (Q298X), found in homozygosis in Family B C5-deficient members, is a nonsense mutation that is expected to give rise to a truncated transcript.

These results are in accordance with the high heterogeneity that characterizes this disorder, with four different mutations found in the four deficiencies studied at the molecular level to date. Further systematic studies will be required to know the real prevalence of this deficiency in the population and to deepen knowledge of the mechanisms underlying its clinical implications.

Acknowledgements

We would like to thank Drs. José Manuel Ramos (Medicina Interna; Hospital Universitario d'Elx, Alicante, Spain) and Paolo Airo (Servizio di Immunologia Clinica; Spedali Civili, Università di Brescia, Brescia, Italy) for sending us the biological samples as well as Drs. Ana Rojas-Mendoza and Osvaldo Graña (from the Structural Bioinformatics Group of Centro Nacional de Investigaciones

Oncológicas, CNIO, Madrid, Spain) for their technical support in the development of the mutant protein models. Last but not least, we are grateful to Dr. Pablo Lapunzina (Unidad de Genética Médica; Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain) for his constant support and his helpful discussions on the genetic analysis.

References

- Atkinson, J.P., 2003. Complement system on the attack in autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 112, 1639–1641.
- Blencowe, B.J., 2002. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 106–110.
- Camey, D.F., Haviland, D.L., Noack, D., Wetzel, R.A., Vik, D.P., Tack, B.F., 1991. Structural aspects of the human C5 gene. Intron/exon organization, 5' flanking region features, and characterization of two truncated cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 266, 18786–18791.
- Cartegni, L., Chef, S.L., Krainer, A.R., 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* 3 (4), 285–298.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.
- Delgado-Cervino, E., Fontán, G., López-Trascasa, M., 2004. C5 complement deficiency in a Spanish family. Molecular characterization of the double mutation responsible for the defect. *Mol. Immunol.* 42, 105–111.
- Drouin, S.M., Corry, D.B., Wetzel, R.A., 2004. Increased inflammation and airway hyperresponsiveness in C5-deficient mice reveal opposite roles for C3a and C5a in mediating Th2 effector functions in experimental asthma. *Mol. Immunol.* 41, 225–236.
- Fairbrother, W.G., Yeh, R.F., Sharp, P.A., Burge, C.B., 2002. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297 (5583), 1007–1013.
- Figueroa, J.E., Densen, P., 1991. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 359–395.
- Fredlund, F., Laursen, N.S., Roversi, P., Jenner, L., Oliveira, C.L.P., Pedersen, J.S., Nunn, M.A., Lea, S.M., Discipio, R., Sottrup-Jensen, L., Andersen, G.R., 2008. Structure and influence of a tick complement inhibitor on human complement component 5. *Nat. Immunol.* 9, 753–760.
- Gerard, C., Gerard, N.P., 1994. C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 775–808.
- Girardi, G., Berman, J., Redecha, P., Spruce, L., Thurman, J.M., Kraus, D., Hollmann, T.J., Casali, P., Caroll, M.C., Wetzel, R.A., Lambris, J.D., Holers, V.M., Salmon, J.E., 2003. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J. Clin. Invest.* 112, 1644–1654.
- Haviland, D.L., Haviland, J.C., Fleischer, D.T., Hunt, A., Wetzel, R.A., 1991. Complete cDNA sequence of human complement pro-C5. Evidence of truncated transcripts derived from a single copy gene. *J. Immunol.* 146, 362–368.
- Karp, C.L., Grupe, A., Schadt, E., Ewart, S.L., Keane-Moore, M., Cuomo, P.J., Kohl, J., Wahl, L., Kuperman, D., Gemmer, S., 2000. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat. Immunol.* 1, 221–226.
- Lambris, J.D., Sahu, A., Wetzel, R.A., 1998. The chemistry and biology of C3, C4 and C5. In: Volanakis, J.E., Frank, M.F. (Eds.), *The Human Complement System in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 83–118.
- Mastellos, D., Papadimitriou, J.C., Franchini, S., Tsonis, P.A., Lambris, J.D., 2001. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J. Immunol.* 166, 2479–2486.
- Ooi, Y.M., Colten, H.R., 1979. Biosynthesis and post-synthetic modification of a precursor (Pro-C5) of the fifth component of mouse complement (C5). *J. Immunol.* 123, 2494–2498.
- Peter, G., Weigert, M.B., Bissel, A.R., Gold, R., Kreutzer, D., Mclean, R.H., 1981. Meningococcal meningitis in familial deficiency of the fifth component of complement. *Pediatrics* 67, 882–886.
- Pfarr, N., Prawitt, D., Kirschfink, M., Schroff, C., Knuf, M., Habermehl, P., Mannhardt, W., Zepp, F., Fairbrother, W., Loe, M., Burge, C.B., Pohlentz, J., 2005. Linking C5 deficiency to an exonic splicing enhancer mutation. *J. Immunol.* 174, 4172–4177.
- Phimister, G.M., Whaley, K., 1990. Measurement of complement. In: Gooi, H.C., Chapel, H. (Eds.), *Clinical Immunology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 81–109.
- Plenge, R.M., Seielstad, M., Padyukov, L., Lee, A.T., Remmers, E.F., Ding, B., Liew, A., Khalili, H., Chandrasekaran, A., Davies, L.R., Li, W., Tan, A.K., Bonnard, C., Ong, R.T., Thalamuthu, A., Pettersson, S., Liu, C., Tian, C., Chen, W.V., Carulli, J.P., Beckman, E.M., Altschuler, D., Alfredsson, L., Criswell, L.A., Amos, C.I., Seldin, M.F., Kastner, D.L., Klareskog, L., Gregersen, P.K., 2007. Sept 20. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 357 (12), 1250–1251.
- Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A., 2003. The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.* 112, 460–467.
- Ross, S.C., Densen, P., 1984. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of Neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* 63, 243–273.
- Ryther, R.C., McGuinness, L.M., Phillips III, J.A., Moseley, C.T., Magoulas, C.B., Robinson, I.C., Patton, J.G., 2003. Disruption of exon definition produces a dominant-negative growth hormone isoform that causes somatotroph death and IGHG II. *Hum. Genet.* 113, 140–148.
- Walport, M.J., 2001a. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 1058–1066.